

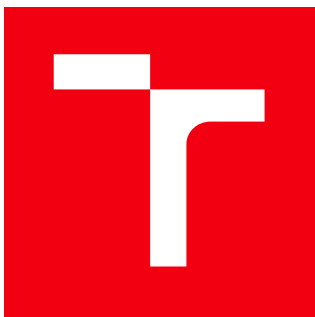
VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Brno, 2018

Ing. Helena Hudečková



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ ODPADŮ Z POTRAVINÁŘSKÝCH VÝROB NA  
BIOPRODUKCI KYSELINY MLÉČNÉ A ETHANOLU**

UTILIZATION OF FOOD PROCESSING WASTE FOR LACTIC ACID AND ETHANOL PRODUCTION

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

DOCTORAL THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Ing. Helena Hudečková

**ŠKOLITEL**

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

**BRNO 2018**

## Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Ing. Helena Hudečková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název dizertační práce:

VYUŽITÍ ODPADŮ Z POTRAVINÁŘSKÝCH VÝROB NA BIOPRODUKCI KYSELINY MLÉČNÉ A ETHANOLU

### Zadání dizertační práce:

Cílem disertační práce jsou možnosti utilizace potravinářských odpadních materiálů pro mikrobiální produkci vybraných metabolitů. V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- výběr a charakterizace vybraných odpadů z potravinářských výrob vhodných pro biotechnologickou produkci organických kyselin a rozpouštědel
- testování a návrh postupu vhodné předúpravy odpadního materiálu před fermentací
- screening a výběr vhodného mikrobiálního producenta pro produkci kyseliny mléčné a ethanolu
- provedení několika fermentací, návrh optimálních podmínek, vyhodnocení výtěžků
- návrh postupu mikroaerobní předúpravy lignocelulózového materiálu a následná anaerobní digesce, sledování produkce organických kyselin a plynů
- komplexní posouzení biotechnologického využití odpadů z potravinářských výrob

**Termín odevzdání dizertační práce: 31.8.2018**

-----  
Ing. Helena Hudečková  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 30.9.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

# Obsah

ABSTRAKT .....	5
ABSTRACT .....	6
1 Úvod .....	8
2 Teoretická část .....	9
2.1 Legislativa o nakládání s odpady .....	9
2.2 Odpady a jejich využití .....	9
2.2.1 Možnosti využití potravinového odpadu .....	10
2.2.2 Odpady po zpracování kávy .....	12
2.2.3 Hroznové výlisky .....	12
2.2.4 Citrusové odpady .....	13
2.2.5 Pekařské odpady .....	14
2.3 Kyselina mléčná .....	14
2.3.1 Výroba kyseliny mléčné .....	15
2.3.2 Biochemie mléčného kvašení .....	17
2.3.3 Přehled producentů kyseliny mléčné .....	21
2.3.4 Využití kyseliny mléčné .....	23
2.3.5 Polymery kyseliny mléčné .....	24
2.4 Ethanol .....	24
2.4.1 Výroba .....	25
2.4.2 Biochemie ethanolového kvašení .....	26
2.4.3 Mikroorganismy .....	27
2.4.4 Suroviny vhodné k ethanolové fermentaci .....	28
2.4.5 Využití ethanolu .....	29
2.5 Anaerobní digesce .....	29
2.5.1 Produkce organických kyselin s krátkým řetězcem .....	29
2.5.2 Mikroaerační metoda .....	30
2.6 Vybrané analytické metody .....	31
2.6.1 Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi-Nelsona .....	31
2.6.2 Turbidimetrie .....	31

2.6.3	HPLC.....	32
2.6.4	Stanovení anthokyanů pH-diferenciální metodou.....	32
2.6.5	Stanovení celkových fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteua .....	33
2.6.6	FOS/TAC titrační metoda .....	33
3	Cíle práce.....	35
4	Experimentální část .....	36
4.1	Použité přístroje a chemikálie .....	36
4.1.1	Použité chemikálie .....	36
4.1.2	Použité mikroorganismy .....	36
4.1.3	Odpadní substráty.....	37
4.2	Použité přístroje.....	37
4.3	Metody stanovení jednotlivých parametrů.....	39
4.3.1	Stanovení redukujících sacharidů metodou podle Somogyi-Nelsona.....	39
4.3.2	Analýza sacharidů, alkoholů a organických kyselin metodou HPLC .....	39
4.4	Charakterizace vybraných substrátů.....	40
4.4.1	Stanovení anthokyanů pH-diferenciální metodou.....	40
4.4.2	Stanovení obsahu polyfenolických látek.....	41
4.4.3	Stanovení obsahu strukturních sacharidů a vlákniny .....	41
4.4.4	Stanovení sušiny a množství vody ve vzorku .....	41
4.5	Metody analýzy mikrobiálních produktů .....	42
4.5.1	Gravimetrické stanovení biomasy.....	42
4.5.2	Stanovení fermentovatelných sacharidů a ethanolu HPLC/RID .....	42
4.5.3	Stanovení organických kyselin HPLC/UV-VIS.....	42
4.6	Metody optimalizace předúpravy substrátů .....	42
4.6.1	Kávová sedlina .....	42
4.6.2	Matoliny .....	43
4.6.3	Pomerančové slupky .....	44
4.7	Metody předúpravy substrátů před fermentací.....	44
4.7.1	Kávová sedlina .....	44

4.7.2	Pomerančové slupky .....	45
4.7.3	Matoliny .....	45
4.7.4	Pečivo .....	45
4.8	Kultivace mikroorganismů .....	46
4.8.1	Příprava kultivačních médií a inokula.....	46
4.9	Produkce kyseliny mléčné.....	47
4.9.1	Screening růstu mikroorganismů na různých sacharidech .....	47
4.9.2	Screening růstu mikroorganismů na hydrolyzátech .....	48
4.9.3	Produkce kyseliny mléčné v bioreaktoru .....	48
4.10	Produkce ethanolu .....	50
4.10.1	Produkce ethanolu na hydrolyzátech vybraných odpadů .....	50
4.10.2	Produkce ethanolu v bioreaktoru.....	51
4.11	Mikroaerobní předúpravy .....	51
4.11.1	Produkce organických kyselin v bioreaktoru .....	51
4.11.2	Stanovení poměru organických kyselin a pufrací aktivity metodou FOS/TAC .....	53
4.11.3	Stanovení koncentrace plynů .....	54
5	Výsledky a diskuse.....	55
5.1	Charakterizace jednotlivých substrátů .....	55
5.1.1	Složení kávové sedliny.....	55
5.1.2	Složení matolin.....	56
5.1.3	Složení pomerančových slupek.....	57
5.2	Optimalizace hydrolyz vybraných substrátů .....	57
5.2.1	Hydrolyzy kávové sedliny.....	58
5.2.2	Hydrolyzy matolin.....	59
5.2.3	Pomerančové slupky .....	61
5.2.4	Shrnutí .....	64
5.3	Produkce kyseliny mléčné.....	64
5.3.1	Screening růstu na vybraných sacharidech .....	65

5.3.2	Screening růstu na jednotlivých hydrolyzátech .....	67
5.3.3	Produkce kyseliny mléčné v bioreaktoru .....	76
5.4	Produkce ethanolu .....	90
5.4.1	Produkce ethanolu v baňkách.....	90
5.4.2	Produkce ethanolu v bioreaktoru.....	91
5.5	Mikroaerační podmínky pro zvýšení produkce organických kyselin .....	93
5.5.1	Vsádkové kultivace .....	93
5.5.2	Přítokované (fed-batch) kultivace .....	96
5.5.3	Kontinuální kultivace .....	99
5.5.4	Porovnání jednotlivých procesů .....	102
6	Závěr.....	104
	POUŽITÁ LITERATURA .....	108
	SEZNAM ZKRATEK .....	119
	Přílohy .....	120
	PUBLIKACE A VÝSTUPY V RÁMCI STUDIA.....	138
	ŽIVOTOPIS .....	139

## ABSTRAKT

Předložena disertační práce je zaměřena především na mikrobiální produkci kyseliny mléčné a ethanolu z odpadů z potravinářských výrob. Jakožto substráty byly vybrány odpad z produkce kávy (kávová sedlina), odpad z produkce vína (matoliny), odpad ze zpracování citrusových plodů (pomerančové slupky). Teoretická část se věnuje shrnutí dosavadních poznatků o odpadech z potravinářských výrob a možnostech jejich zpracování. Pojednává také o vybraných metabolitech (kyselina mléčná, ethanol), na které mohou být tyto odpady využívány.

Část experimentů se zabývala především charakterizací a optimalizací hydrolyz pro maximalizaci množství fermentovatelných sacharidů. Byly provedeny různé kombinace chemických, fyzikálních a enzymatických hydrolyz vybraných substrátů. Následně byl vybírán vhodný produkční kmen kyseliny mléčné a ethanolu. V případě produkce kyseliny mléčné bylo vybráno 7 kmenů (*Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bacillus coagulans* CCM 2013, *Bacillus coagulans* CCM 2658, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Streptococcus thermophilus* CCM 4757), které byly kultivovány nejprve na syntetických médiích s obsahem různých sacharidů a následně byly testovány na konkrétních hydrolyzátech odpadních substrátů. V případě produkce ethanolu byly testovány 2 kmeny (*S. cerevisiae* CNCTC 6646 a *S. cerevisiae* CNCTC 6651) na hydrolyzátech jednotlivých odpadních substrátů.

Následně byla věnována část experimentů produkci kyseliny mléčné a ethanolu na hydrolyzátech jednotlivých odpadních substrátů za kontrolovaných podmínek v bioreaktoru. Závěrečná část předložené disertační práce se zabývala testováním mikroaerobní předúpravy lignocelulosového materiálu pro zvýšení produkce organických kyselin během acetogenní fáze anaerobní digesce.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** odpady z potravinářských výrob, hydrolyza, fermentace, kyselina mléčná, ethanol, anaerobní digestce



## ABSTRACT

The doctoral thesis is focused on the microbial production of lactic acid and ethanol using food processing waste as substrate. Coffee processing waste (spent coffee grounds), wine production waste (grape pomace) and orange processing waste (orange peel) were chosen as substrates for experiments. The theoretical part is dedicated to summarizing current knowledge about waste from food production and possibilities of its processing. It also deals with selected metabolites (lactic acid, ethanol) to which these wastes can be used.

Part of the experiments was focused on the characterization and optimization of hydrolysis to maximize the amount of fermentable saccharides. Different combinations of chemical, physical and enzymatic hydrolysis of selected substrates have been tested. Subsequently, a suitable strain for lactic acid and ethanol production was searched for. In the case of lactic acid production, 7 bacterial strains were selected (*Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bacillus coagulans* CCM 2013, *Bacillus coagulans* CCM 2658, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Streptococcus thermophilus* CCM 4757). These strains were first cultivated on the synthetic media containing different kind of saccharides. Afterward, the cultivation on the waste biomass hydrolysates were tested. In the case of ethanol production, 2 yeast strains kmeny (*S. cerevisiae* CNCTC 6646 a *S. cerevisiae* CNCTC 6651) were cultivated on hydrolysates of individual waste substrates.

Subsequently, the experiments focused on the production of lactic acid and ethanol on hydrolysates of waste biomass in bioreactor were done. The last part of this doctoral thesis deals with the microaerobic pretreatment of lignocellulosic biomass to increase the production of organic acids during the acetogenic phase of anaerobic digestion.

**KEY WORDS:** food processing waste, hydrolysis, fermentation, lactic acid, ethanol, anaerobic digestion

HUDEČKOVÁ, H.. *Využití odpadů z potravinářských výrob na bioprodukcí kyseliny mléčné a ethanolu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 139 s. Vedoucí disertační práce prof. RNDr. Ivana Márová, Csc.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Disertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího disertační práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala školitelce mé disertační práce prof. RNDr. Ivaně Márové, Csc. za vedení a odborné rady. Velké poděkování také patří doc. Ing. Stanislavu Obručovi za pomoc a cenné rady. Poděkování patří také mým kolegům, a především rodině za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.*

# 1 Úvod

Předložená práce se zaměřuje především na problematiku odpadů z potravinářských výrob a možnosti jejich zpracování. Odpady ze zemědělského a potravinářského průmyslu jsou v dnešní době jednou z příčin znečištění životního prostředí. Poměrně velká množství těchto odpadů, která jsou ročně vyprodukována, vyvolávají vážné ekonomické i ekologické problémy. Tyto odpady však obsahují poměrně vysoká množství polysacharidů, které mohou být dále využity. Dochází tedy i k relativně velkým ztrátám cenných surovin.

Mnohé z těchto odpadů mají potenciál pro komplexní použití například v konceptu biorafinérií. Využití potravinářského odpadu jakožto sekundárního zdroje energie nebo substrátu pro fermentace by mohlo pomoci s eliminací konkurence využívání půdy na pěstování surovin pro potraviny a biomasy pro fermentace. V Evropské unii je v současnosti tendence využití odpadu z jednoho průmyslového sektoru jako suroviny pro jiná průmyslová odvětví. Jedná se o koncept tzv. průmyslové symbiózy. Pro uplatnění této koncepce v odvětví zpracování potravin je hlavní především identifikace, kvantifikace a charakterizace konkrétních odpadů. Na základě identifikace a charakterizace je možno nalézt možnosti jejich využití a vhodné technologie zpracování. Průmyslová symbióza závisí také na dostupnosti mezi výrobcí potravinových odpadů a potenciálními odběrateli. V současnosti se výzkum v oblasti zpracování potravinového odpadu zaměřuje především na nalezení efektivního způsobu produkce biopaliv a bioproduktů. Tento způsob zpracování je výhodný pro životní prostředí z hlediska snižování emisí methanu na skládkách a zachování přírodních zdrojů (např. fosilních paliv).

Tyto odpady mohou být využity například pro produkci kyseliny mléčné či ethanolu. Kyselinu mléčnou a ethanol je možno vyrábět chemicky, ale především i biotechnologicky. V současnosti se výzkum v oblasti biotechnologické výroby těchto látek ubírá směrem ke snižování cen produkce a získání kvalitního produktu. Obojího může být dosaženo například využitím odpadních materiálů jako substrátů pro fermentace, optimalizací produkce či výběrem vhodného mikroorganismu. Další možností může být využití těchto odpadů pro anaerobní digesci.

Cílem této práce je zpracování literárního přehledu zaměřeného na odpady a jejich zpracování. Za účelem biotechnologické produkce je diskutována možnost využití vybraných odpadů z potravinářských výrob pro produkci kyseliny mléčné a ethanolu. Součástí práce je také testování mikroaerobní předúpravy lignocelulosového materiálu před anaerobní digescí, které bylo součástí zahraniční stáže na ZHAW (Zurich University of Applied Sciences) ve Švýcarsku.

## **2 Teoretická část**

### **2.1 Legislativa o nakládání s odpady**

Prevence vzniku a nakládání s odpady je legislativně ošetřena. V České Republice je to konkrétně zákonem o odpadech č. 185/2001 Sb. V květnu 2010 byl tento zákon doplněn novelizací č.154/2010 Sb. Tato novelizace byla vytvořena na základě evropské směrnice 98/2008/ES [1].

Tuto směrnici přijal v roce 2008 Evropský parlament a Rada Evropské unie. Jedná se o základní evropský právní dokument odpadového hospodářství, který je platný pro všechny členské státy EU včetně České republiky. Ukládá jednotlivým státům, aby bylo o odpady postaráno a zároveň byly případně využity. Měly by být recyklovány nebo použity na výrobu energie. Pokud odpady není možno nějakým způsobem využít, mohou být bezpečně odstraněny [1][2].

### **2.2 Odpady a jejich využití**

Odpady ze zemědělství a potravinářského průmyslu jsou v dnešní době jednou z příčin znečištění životního prostředí. Ročně jsou produkována velká množství odpadního materiálu ze zemědělství a zpracování jeho produktů. Patří zde například zbytky ze zpracování kukuřice, vylisovaná cukrová třtina, rýžová a pšeničná sláma, z nichž mnohé jsou v současnosti zkoumány jakožto potenciální suroviny pro výrobu produktů s přidanou hodnotou. Odpady z potravinářského průmyslu zůstávají prozatím z velké části nevyužity, ale možnosti jejich využití by však měly být intenzivně zkoumány. Mezi tyto odpady patří například výlisky z citrusů, jablek a hroznů, dále pak například řízky ze zpracování cukrové řepy na výrobu cukru. Velká množství těchto odpadů vyvolávají vážné problémy z ekonomického i ekologického hlediska. Zároveň však dochází k velkým ztrátám cenných surovin. Obsahují totiž vysoká množství polysacharidů, které mohou být dále využity [3].

Mnohé z těchto odpadů mají potenciál pro použití v jiných výrobních systémech. Mohly by nalézt uplatnění například v konceptu biorafinérií. V Evropské unii je v současnosti trend tzv. průmyslové symbiózy, ve které je cílem využít odpad z jednoho sektoru jako surovinu pro jiná odvětví. Potravinářský průmysl je považován za relevantní odvětví pro koncept biorafinérií, a to zejména kvůli potenciálnímu využití zbytků vznikajících v tomto průmyslu. Využití potravinářského odpadu jakožto sekundárního zdroje energie nebo substrátu pro fermentace by mohlo pomoci s eliminací konkurence využívání půdy na pěstování surovin pro potraviny a biomasy pro fermentace [3].

Pro uplatnění koncepce průmyslové symbiózy v odvětví zpracování potravin je hlavní především identifikace, kvantifikace a charakterizace průmyslových přebytků. Poté je možno nalézt možnosti jejich využití a vhodně technologie pro jejich další zpracování. Průmyslová

symbióza závisí také na dostupnosti producentů potravinového odpadu a potenciálních odběratelů [3].

### **2.2.1 Možnosti využití potravinového odpadu**

Odpady z potravinového průmyslu jsou produkovány především ve formě pevné a kapalné. Pevný odpad je část výchozího materiálu, který nemůže být využit pro výrobu zamýšlených produktů. Jedná se hlavně o odpady, jako jsou slupky, semena a vlákna z ovoce, které jsou odstraněny při výrobě šťáv [4].

Z hlediska složení je potravinový odpad charakterizován rozdílným chemickým složením závislým na jeho původu. Potravinové odpady tedy mohou obsahovat směs sacharidů, lipidů a proteinů, anebo pouze jednu z těchto složek [5].

V současnosti se výzkum v oblasti zpracování potravinového odpadu zaměřuje na nalezení efektivního a stabilního způsobu pro získání biopaliv a bioproduktů. Tento způsob zpracování je výhodný pro životní prostředí z důvodu snižování emisí methanu na skládkách a zachování přírodních zdrojů, jako je uhlí a fosilní paliva [5].

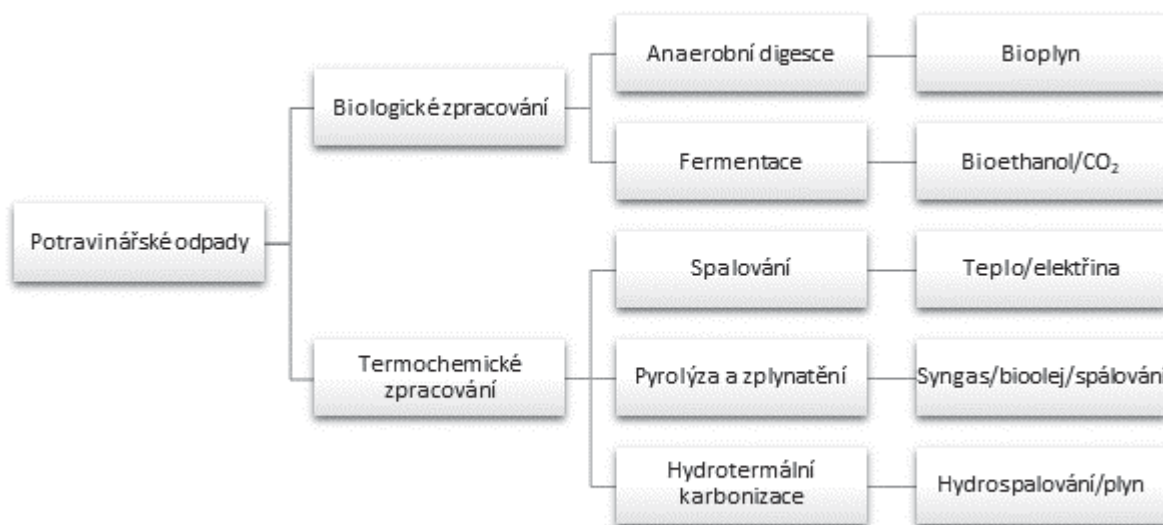
#### *2.2.1.1 Produkce biopaliv a bioenergie*

V závislosti na složení mohou být produkována z potravinového odpadu různá biopaliva, a to pomocí bioproduktu či termochemického procesu. Potravinové odpady mohou být přeměněny na biopaliva nebo bioenergie následujícími procesy:

- transesterifikace olejů a tuků pro produkci biodieselu,
- fermentace sacharidů na bioethanol nebo biobutanol,
- anaerobní digesce za vzniku bioplynu (plyn bohatý na metan),
- fermentační produkce vodíku,
- pyrolýza a zplynatění,
- hydrotermická karbonizace,
- spalování [5].

Ne všechny vyjmenované procesy jsou v současnosti plnohodnotně využívány na průmyslové úrovni. Například využití potravinového odpadu jako substrátu pro biologickou produkci vodíku je předmětem mnoha studií, nicméně doposud nebyla provedena žádná plnohodnotná aplikace. Proces spalování je vyspělá technologie aplikovaná pro redukci odpadového objemu a produkci elektrické energie a tepla. Nicméně spalování potravinového odpadu je poněkud problematické z hlediska vysokého obsahu vody, který limituje jeho aplikovatelnost a zvyšuje emise. Výhodnější je technologie využívající anaerobní digesce, o kterou je neustále rostoucí zájem a má širokou aplikovatelnost. Vysoká biodegradabilita a obsah vlhkosti jsou vlastnosti potravinového odpadu vhodné pro výrobu

bioplynu. Zbytky z produkce bioplynu mohou být následně použity pro zlepšení půdy nebo její rozklad, případně jako zdroj živin (např. amoniak nebo struvit) [5][6][7][8][9].



Obrázek 1: Technologie zpracovávající potravinové odpady na energii [7]

#### 2.2.1.2 Produkce biomateriálů z odpadů

Problém s úbytkem fosilních zdrojů je v poslední době řešen vývojem sloučenin a polymerů na bázi obnovitelných zdrojů. O produkci biopolymerů je stále rostoucí zájem a je možnost využít při ní zbytky ze zemědělství i potravinové odpady. Odpovídající monomery jsou tvořeny fermentací sacharidů v daném substrátu pomocí mikroorganismů. Produkce biologických metabolitů, které mohou být použity jako obnovitelné a biologicky rozložitelné náhražky petrochemických produktů, je v současnosti středem zájmu. Mezi tyto metabolity patří:

- laktát – pro výrobu polylaktátu, bioplast;
- polyhydroxyalkanoáty (zejména polyhydroxybutyrát) - jsou přirozeně tvořeným polymerem mnoha bakteriálních druhů a mají podobné vlastnosti jako polyethylen či polypropylen;
- sukcinát – cenný a flexibilní prekurzor využitelný ve farmacii, plastech a pro výrobu detergentů [10][11][12].

Pokud jde o výrobu biopaliv z přírodních surovin, rozvinula se intenzivní diskuse také okolo výroby bioplastů z přírodních materiálů. Vzniká zde otázka ohledně negativního dopadu v oblasti konkurence pěstování plodin pro lidskou potravu s pěstováním surovin na bioprodukcí. V této souvislosti je možnost využití potravinářského odpadu při výrobě bioplastů nejlepším řešením [11][14].

### 2.2.2 Odpady po zpracování kávy

Káva je jedním z nejpobulárnějších nápojů na světě, především pro její příjemnou chuť, stimulační a osvěžující vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou určeny složením zelených bobů a změnami vzniklými během procesu pražení. Po ropě je káva druhou největší obchodovanou komoditou na světě. Popularita kávy se v posledních 150 letech neustále rozšiřovala. V období 2010-2011 byla celosvětová roční produkce kávových zrn asi 8 milionů tun. Kávový průmysl je zodpovědný za tvorbu velkého množství odpadů, na prvním místě je především kávová sedlina [14][16][17].

Kávová sedlina je pevný zbytek vytvořený během přípravy kávy nebo při výrobě instantní kávy. V průměru vznikne přibližně 650 kg kávové sedliny z jedné tuny zelené kávy. Je tvořena hlavně z hemicelulos (30–40 hm. %), konkrétně obsahuje mannany, galaktany a arabinany. Obsah celulosy je přibližně 10 hm. %. Mimo to kávová sedlina obsahuje značné množství (zhruba 15 hm. %) oleje. Dalšími látkami přítomnými v kávové sedlině jsou lignin (cca 30 hm. %) a polyfenoly (2,5 hm. %), které tvoří převážně vysoce biologicky dostupné a bioaktivní chlorogenní kyseliny. Vzhledem k přítomnosti kofeinu, tříslovin a polyfenolů může kávová sedlina představovat riziko znečištění, pokud jsou vypouštěny do životního prostředí. Navíc, když jsou odpady na bázi kávové sedliny nahromaděny, mohou spontánně kvasit a způsobit hoření. Vzhledem k jejich vlastnostem a také kvůli velkému množství globálně produkovaných odpadů ze zpracování kávy, je eliminace nebo dokonce další valorizace důležitým tématem nejen pro odvětví kávového průmyslu [17][18][19][20].

Byly provedeny studie zabývající se využitím kávové sedliny jako substrátu pro výrobu ethanolu, bionafty, polyhydroxyalkanoátů či polyfenolických látek. Vzhledem k vysoké výhřevnosti kávových sedlin bylo také zkoušeno jejich využití jako paliva pro kotle využívané v kávovém průmyslu. Nicméně žádná z těchto strategií nebyla dosud zavedena v průmyslovém měřítku. Většina těchto odpadů zůstává stále nevyužita a je vypouštěna do životního prostředí nebo spálena [15][20][21][22][23][24][19].

### 2.2.3 Hroznové výlisky

Hrozny révy vinné jsou jednou z největších a ekonomicky významných ovocných plodin na světě. Většina hroznů se používá pro vinařství a menší část je využívána na výrobu šťáv. Matoliny jsou hroznové výlisky po extrakci moštu ze rmutu. Tvoří je především semínka, slupky a stonky. Z chemického hlediska vylišovaná dužina obsahuje především celulosu, hemicelulosu, pektinové polysacharidy složené z homogalakturonanu, rhamnogalakturonanu a dalších sacharidů. Jejich chemické složení je bohaté na základní živiny vyžadované pro růst široké škály mikroorganismů. Tento odpadní produkt obsahuje vysoký podíl ligninu, celulosy a vysoké procento výživných minerálních prvků, zvláště dusíku a draslíku, vhodných pro mikrobiální růst. Obsah jednotlivých látek ve výliscích se liší podle odrůdy hroznů [25].



Matolina je dnes jedním z nejvýznamnějších odpadních produktů zemědělského průmyslu. Přibližně 20 % ze zpracovaných hroznů ve vinařství tvoří tyto odpady. Velká množství takového odpadu způsobují ekologický a ekonomický problém v nakládání s odpady. Přesto nabízí poměrně velký potenciál využití. Například v Itálii se z výlísků modrých hroznů vyrábí v parních destilačních kotlích grappa, ze semínek se lisuje hroznový olej, oceňovaný zejména labužníky. Konečný zbytek se buď suší odpadním teplem z destilace grappy a využívá jako palivo pro vyvíječe páry, nebo se suší na pokrutiny pro skot. Matoliny jsou v zahraničí využívány i jinými speciálními technologiemi. Druhotné zpracování odpadu po lisování rmutu lze tedy optimálně využít při tzv. bezodpadových technologiích [26][27][28].

Nejčastěji se hroznové výlisky kompostují, zpracovávají jako zvířecí krmivo s nízkou nutriční hodnotou nebo pro bioprodukci ethanolu (nízká výtěžnost). Matoliny je možno využít pro extrakci hroznového oleje a polyfenolů, avšak pro tyto účely se využije pouze malá část vytvořeného odpadu. Hroznové výlisky však mohou být využity na bioprodukci některých hodnotných chemikálií, jako kyselina citronová, glukonová, karotenoidy, xantan a ethanol. Odpad z hroznové révy může být použit také pro produkci enzymů (celulas, pektinas, xylanas) pomocí plísní *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Monascus purpureus* [26][27][28].

#### 2.2.4 Citrusové odpady

Světová produkce citrusových plodů je více než 88 milionů tun ročně. Hlavním ovocem v této skupině jsou pomeranče (*Citrus sinensis*) tvořící asi 70 % celkové produkce a spotřeby citrusových plodů. Další citrusové plody pěstované ve větší míře jsou např. mandarinky (*Citrus reticulata*), grapefruity (*Citrus vitis*), limetky (*Citrus aurantifolia*) a citrony (*Citrus limonum*). Téměř polovina z těchto druhů ovoce je vymačkána na džus a zbytek tvořený slupkami, segmentovými membránami a dalšími vedlejšími produkty se považuje za citrusový odpad [29][30].

Nejčastějšími způsoby nakládání s odpadem z citrusů jsou kompostování, anaerobní digesce, spalování, termolýza či zplyňování. Citrusové odpady mohou být použity také pro extrakci pektinu nebo být peletizované na krmivo pro zvířata. Nicméně velká část citrusových odpadů je nadále každoročně ukládána na skládky. Přímá likvidace citrusových odpadů (bez řádného zpracování) způsobuje problémy v životním prostředí. Je proto důležité systematicky zpracovávat citrusový odpad v potravinářském průmyslu a dalších oblastech. Citrusové odpady obsahují různé polysacharidy, které z nich činí zajímavý substrát využitelný pro fermentace [29][30].

Bylo provedeno několik studií zabývajících se využitím citrusových odpadů na bioprodukci různých látek. Konkrétně bylo testováno využití citrusových odpadů pro produkci bioethanolu, bioplynu, aromaticky aktivních látek. Hlavní překážkou použití



citrusového odpadu jako substrátu pro fermentace je přítomnost limonenu. Ten je vysoce toxický pro mikroorganismy, působí inhibičně na jejich růst a snižuje tedy výtěžnost produkce. Proto je vhodné jej vyextrahovat z citrusových odpadů před hydrolýzou nebo fermentací. Vyextrahovaný limonen je dále možno použít v kosmetickém průmyslu jako složka voňavek, případně jako insekticid pro rostliny [29][31][32][33].

### 2.2.5 Pekařské odpady

Jelikož jsou pekařské výrobky produkovány v přebytku pro uspokojení poptávky zákazníků, část pečiva zůstane na pultech obchodů neprodána a vrací se zpět do pekárny. V Evropské unii množství odpadu z pekařského průmyslu tvoří asi 7 % celkové produkce pečiva. Průměrně je tedy nevyužito 1,3 milionu tun pečiva ročně. Pekárny mají jen omezené množství možnosti, jak naložit s odpadním pečivem. Část tohoto odpadu je použita na výrobu strouhanky nebo jako krmivo pro hospodářská zvířata. Nicméně vzhledem k časté mikrobiální kontaminaci je využití odpadního pečiva jako složka potravy pro lidi i zvířata nemožné. Odpadní pečivo tak většinou končí na skládkách. Lepším řešením je využití odpadního pečiva jako substrátu pro bioprodukcí využitelných chemikálií. Byly provedeny i studie na využití odpadního pečiva jako substrátu pro produkci kyseliny mléčné, amylas a proteas pomocí plísně *Aspergillus awamori*, vodíku pomocí *Arctinobacillus succinogenes* nebo aromatických sloučenin plísní *Geotrichum candidum* [34].

Chléb, jakožto výrobek z pšeničné a žitné mouky, obsahuje značné množství škrobu, který lze hydrolyzovat a následně využít pro fermentaci. Celkový obsah škrobu v chlebu je přibližně 500–750 g na kilogram sušiny, jednoduchých cukrů pak 3–50 g. Chléb také obsahuje v jednom kilogramu sušiny 100–150 g proteinů, které po hydrolýze na aminokyseliny představují zdroj živin pro růst a metabolismus mikroorganismů [35].

Během procesu pečení chleba se škrob podrobuje významným změnám. Část z něj je zgelovatělá a částečně depolymerizována, což může usnadnit jeho následnou hydrolýzu během rozmělnění. Část chlebového škrobu je vázána ve směsi s dalšími složkami mouky, což komplikuje jeho extrakci a distribuci. Řešením tohoto problému může být dodatečná enzymatická hydrolýza komplexními preparáty obsahujícími kromě amylas i enzymy rozkládající neškrobové polysacharidy a proteiny. To může zvýšit dostupnost sacharidů pro kvasinky a hydrolýzu lepku, ze kterého se může uvolnit vázaný škrob a poskytnout volné aminokyseliny, které jsou zdrojem dusíku pro mikroorganismy [34][36].

## 2.3 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná (kyselina 2-hydroxypropionová) je přírodní organická kyselina. Jedná se o nejjednodušší hydroxykyselinu s asymetrickým atomem uhlíku. Nachází se ve dvou opticky

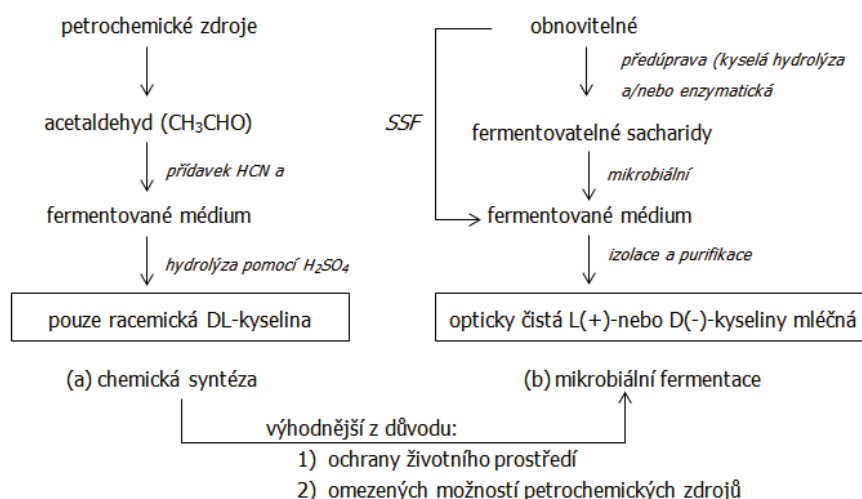
aktivních formách. Oba enantiomery D(-) a L(+) mohou být produkovány použitím příslušných bakteriálních kmenů [41].

Tato kyselina je využívána převážně v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Využívá se také pro výrobu okysličených chemikálií, regulátorů růstu rostlin a speciálních chemických meziproduktů [41].

### 2.3.1 Výroba kyseliny mléčné

Kyselina mléčná může být vyrobena buď chemickou syntézou, nebo mikrobiální fermentací. Chemická syntéza z petrochemických zdrojů vede vždy k racemické směsi DL-kyseliny mléčné, což je hlavní nevýhodou této metody [13][14].

Téměř všechna v současnosti vyráběná kyselina mléčná je produkována fermentačně. Jako producenti jsou nejvyužívanější bakterie mléčného kvašení, které jsou v porovnání s jinými mikroorganismy účinnější [13][14].



Obrázek 2: Porovnání chemického a biotechnologického způsobu výroby kyseliny mléčné [37]

#### 2.3.1.1 Chemická syntéza

Chemická syntéza kyseliny mléčné je hlavně založena na hydrolyze laktonitrilu silnou kyselinou. Dalšími způsoby mohou být alkalicky katalyzovaná degradace cukrů, oxidace propylenglykolu, reakce acetaldehydu s oxidem uhličitým a vodou za vysoké teploty a tlaku či hydrolyza kyseliny chlorpropionové. Tyto způsoby však nejsou technicky a ekonomicky realizovatelné pro průmyslovou výrobu kyseliny mléčné [38][39].

### 2.3.1.2 Fermentační výroba

Mikrobiální produkce kyseliny mléčné je výhodnější z hlediska možnosti využití obnovitelných zdrojů biomasy, nízké výrobní teploty a spotřeby energie. Hlavní výhodou této produkce je možnost získání opticky vysoce čisté kyseliny mléčné v závislosti na výběru vhodného kmene. Optická čistota kyseliny mléčné je rozhodujícím faktorem v průmyslových odvětvích založených na výrobě kyseliny mléčné a řada studií se zabývá biotechnologickou produkcí opticky čisté kyseliny mléčné [14][38][40][41].

Poptávka po kyselině mléčné se značně zvyšuje díky širokému rozsahu aplikací. Jednou z hlavních nevýhod fermentační výroby, oproti chemické syntéze, jsou náklady na substráty pro fermentaci (např.: škroby, rafinované cukry, lignocelulosoové materiály). Levné suroviny jsou nezbytné pro proveditelnost biotechnologické produkce kyseliny mléčné. Výrobci polymerů a další průmysloví uživatelé obvykle vyžadují velké množství kyseliny mléčné za relativně nízké ceny. Použití nízkonákladových nepotravinářských surovin pro výrobu kyseliny mléčné je zajímavější, protože nemají žádný vliv na lidský potravní řetězec. V současnosti nabízí vysoký potenciál lignocelulosoové materiály ze zemědělských, zemědělsko-průmyslových a lesnických zdrojů. Představují potenciálně levnější a obnovitelné zdroje sacharidů využitelných pro fermentační produkci kyseliny mléčné, a to vzhledem k jejich širokému výskytu, nízké ceně, vysokému obsahu polysacharidů a obnovitelnosti. Bohužel bakterie mléčného kvašení mají nedostatek hydrolytických enzymů pro přímou biokonverzi celulosy a hemicelulosy, které jsou v lignocelulosoových materiálech těsně spojeny s ligninem. Proto jsou prováděny četné výzkumy vyvíjející biotechnologické postupy pro výrobu kyseliny mléčné, které by učinily tento proces účinnější a úspornější [13][14][42].

Dalším problémem fermentační produkce kyseliny mléčné jsou provozní náklady. Nákladná je například sterilizace, která je nezbytná pro fermentační produkci kyseliny mléčné. Obvykle se pro průmyslové aplikace používají mikroorganismy s optimální fermentační teplotou 30 - 42 °C. Proto je obtížné vyhnout se kontaminaci, pokud médium není sterilizováno. Fermentativní produkce kyseliny L-mléčné bez sterilizace je možná některými termofilními kmeny, např. *Bacillus coagulans*. Tento kmen je schopen relativně vysokých výtěžků opticky čisté kyseliny L-mléčné. Možnost fermentace bez nutnosti sterilizace nabízí možnost snížení spotřeby energie a nákladů na vybavení [38][39][43].

Separční a purifikační procesy kyseliny mléčné následující po fermentaci bohužel také zvyšují náklady na produkci. Mléčná fermentace probíhá okolo pH 6,5. Při zvyšování koncentrace kyseliny mléčné se její disociací uvolňuje  $H^+$  kationt, který snižuje hodnotu pH, proniká do buněk mikroorganismů a zabíjí je. V klasických průmyslových bioprocesech se do média přidává uhličitan vápenatý, aby se udržovala nízká koncentrace volné kyseliny mléčné, čímž dojde k zabránění inhibice bakterií. Nevýhodou však je to, že přidáním zásady přechází

kyselina mléčná na laktát. Ten je třeba zpětně převést na kyselinu mléčnou silnou minerální kyselinou, což představuje značné komplikace a zvýšení nákladů na výrobu. Byly však vyvinuty některé nové procesy, které nevytvářejí laktát vápenatý, a to reverzní osmóza, ultrafiltrace, elektrodialýza a extrakce rozpouštědlem [43][44][45].

### *2.3.1.3 Izolace a purifikace kyseliny mléčné*

Purifikace a izolace produktu je důležitým krokem při výrobě kyseliny mléčné, který je spojen se separací a čištěním kyseliny mléčné od fermentačního média. Purifikace kyseliny mléčné je jedním s finančně nejnáročnějších kroků v procesu výroby. Fermentační médium obsahuje množství nečistot, jako jsou zbytkové cukry, barviva, živiny a další organické kyseliny, které jsou součástí buněčné hmoty. Tyto nečistoty musí být odstraněny, aby bylo získáno větší množství čisté kyseliny mléčné. Velkou pozornost je třeba věnovat přidávání levných živin do média, protože odstranění nečistot může výrazně zvýšit náklady na purifikaci. Metody redukce nečistot v konečném produktu zahrnují extrakci, membránovou separaci, iontovou výměnu a destilaci s chemickou reakcí [46][13].

Jelikož životní prostředí je pro průmyslové účely hlavním problémem, jsou využívány procesy obnovy a čištění fermentačně vyráběné kyseliny mléčné s cílem omezení tvorby odpadů. Nejčastěji využívanou metodou je purifikace kyseliny mléčné přidáním uhličitanu vápenatého do média a pH je upraveno na 10. Následuje zahřívání a filtrace média. Tento proces převede všechnu kyselinu mléčnou na laktát vápenatý, vysráží proteiny v médiu, usmrtí buňky, odstraní přebytek uhličitanu vápenatého a pomáhá rozkladu zbytkových cukrů v médiu. Kyseliny mléčné je poté získána hydrolýzou, esterifikací a destilací. Rozpouštědlo je odstraněno odpařením a poté jsou soli rozloženy na výslednou volnou kyselinu mléčnou. Nicméně existují další alternativní metody purifikace kyseliny mléčné bez použití uhličitanu vápenatého jako elektrodialýza, použití membránového bioreaktoru, membránová extrakce s kapalným surfaktantem či adsorpce. Tyto metody nabízejí velký potenciál a mají výhodu simultánní separace a koncentrace kyseliny mléčné. Výběr separační metody je založen na účinnosti a ekonomickém využití výsledné kyseliny mléčné [47].

### **2.3.2 Biochemie mléčného kvašení**

Mikroorganismy produkující kyselinu mléčnou používají pyruvát jako prekurzor pro její produkci. Konverze kyseliny pyrohroznové na kyselinu mléčnou může být katalyzována dvěma typy enzymů: NAD-dependentní L-laktátdehydrogenasou a NAD-dependentní D-laktátdehydrogenasou [13][14].

### 2.3.2.1 *Metabolismus kyseliny mléčné u bakterií*

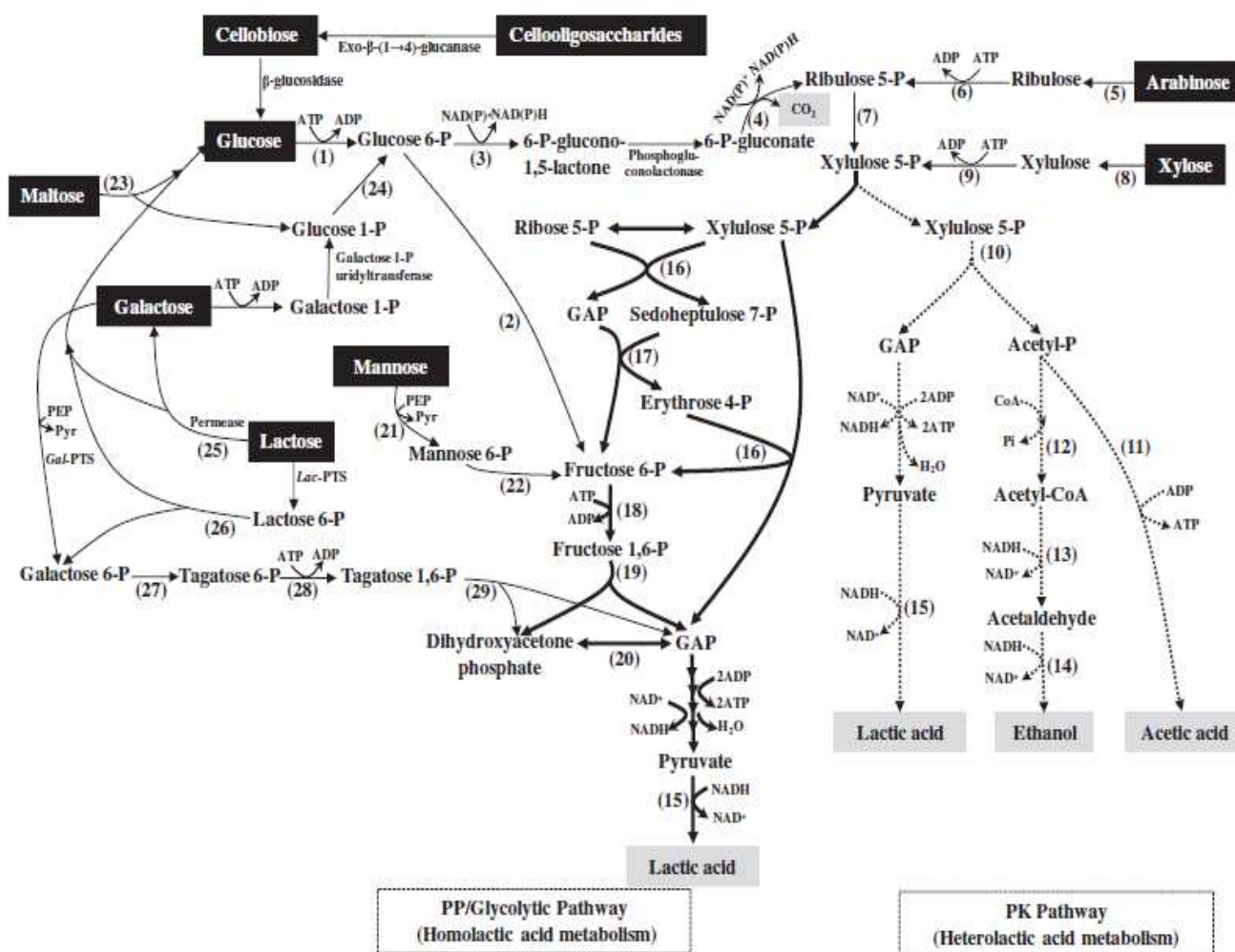
Cukry jsou primárním zdrojem uhlíku a energetickým zdrojem pro růst bakterií mléčného kvašení na různých substrátech. Podle toho, jakým způsobem bakterie fermentují sacharidy, se dělí na homofermentativní a heterofermentativní [14].

Homofermentativní bakterie mléčného kvašení (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a některé druhy rodu *Lactobacillus*) fermentují cukry pomocí Embden-Meyerhoff-Parnasovy dráhy na pyruvát, který je přeměněn na kyselinu mléčnou pomocí laktát-dehydrogenasy (LDH). Dva typy isomerů laktátu (L- a D-) mohou být produkovány stereospecifickým NAD-dependentním enzymem, L-LDH a D-LDH. Za určitých růstových podmínek, jako limitace uhlíku, homofermentativní metabolismus může být přesunut na směsný kyselinotvorný metabolismus, kde je kromě laktátu produkován mravenčan, octan, ethanol a/nebo oxid uhličitý [14].

Heterofermentativní bakterie mléčného kvašení (*Leuconostoc*, *Oenococcus* a určité druhy rodu *Lactobacillus*) fermentují cukry hlavně pomocí fosfoketolasové dráhy (PKP, také známé jako fosfoketolasový zkrat nebo 6-fosfoglukonová dráha). Fermentace pentos jako xylosa a ribosa vede k tvorbě pyruvátu a acetyl-P a jejich konverzi na laktát a octan. Hexosy (glukosa, fruktosa, mannosy) mohou být přeměněny na laktát, oxid uhličitý a ethanol. Oxid uhličitý je produktem degradace 6-P-glukonátu, který vzniká během přeměny hexos na pentosy. Specifický enzym heterofermentativní dráhy je D-xylosa-5-P fosfoketolasa, která katalyzuje přeměnu xylulosa-5-P na glyceraldehyd-3-fosfát (GAP) a acetyl-P [14][48].

Fermentační typ (homo- nebo hetero-) je zajímavým taxonomickým kritériem. Rod *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Weisella*, tak jako některé druhy *Lactobacillus* (např.: *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus reuteri*) jsou obligátně heterofermentativní. Ostatní laktobacily, jako *L. acidophilus*, *L. delbrückii*, *L. helveticus* a *L. salivarius* jsou obligátně homofermentativní a nemají schopnost metabolizovat pentosy. Druhy *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei* a většina bakterií mléčného kvašení mohou však homofermentativně využít hexosy a pentosy a jsou známy jako fakultativně heterofermentativní [14][48].

Pyruvát má klíčovou roli ve fermentačních drahách, obvykle se chová jako akceptor elektronu pro tvorbu laktátu a pomáhá udržet intracelulární redoxní rovnováhu. Nicméně v závislosti na druhu bakterií mléčného kvašení, pyruvát může být metabolizován různými enzymy vedoucí ke vzniku různých metabolitů jako diacetyl/acetoin, kyselina mravenčí a acetyl-CoA, ze kterých mohou následně vznikat ethanol nebo ATP a acetát. Také kyslík a fruktosa mohou být využity jako alternativní akceptory elektronu místo pyruvátu. Kromě schopnosti fermentovat monosacharidy, jsou bakterie mléčného kvašení schopny použít také disacharidy jako substrát [14][48].

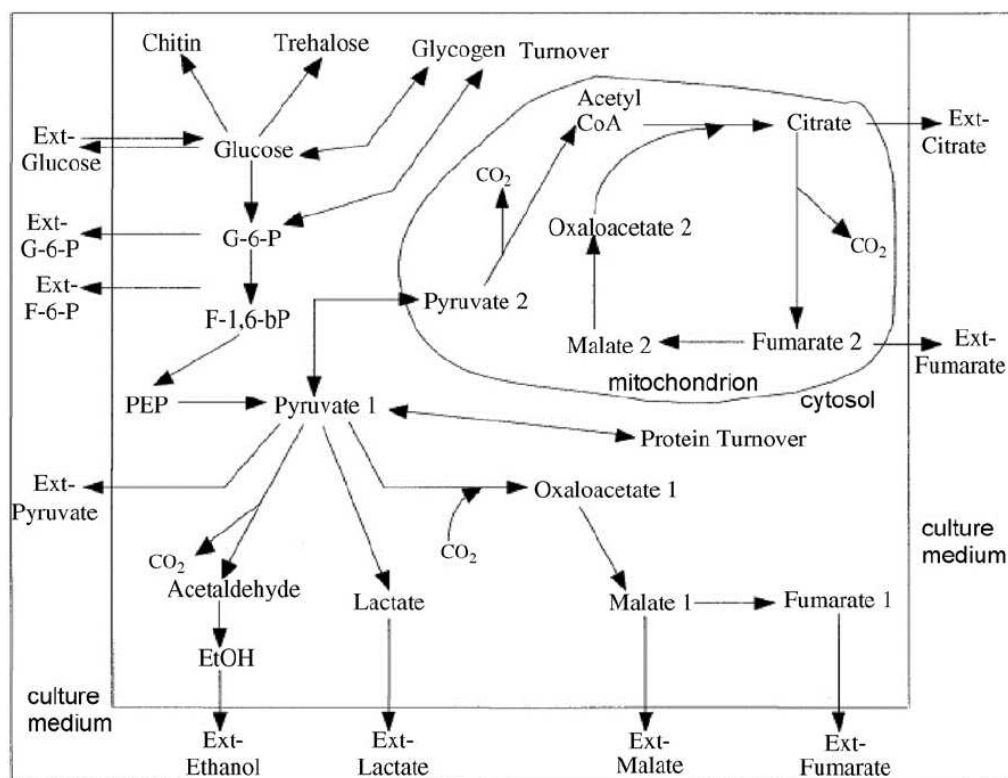


Obrázek 3: schéma vzniku kyseliny mléčné z celobiosy [14]

### 2.3.2.2 Metabolismus kyseliny mléčné u plísní

Produkce kyseliny mléčné u plísní se liší od bakterií především v tom, že se jedná o aerobní proces. Schopnost produkovat kyselinu mléčnou mají hlavně plísně rodu *Rhizopus*. Jednotlivé druhy tohoto rodu se rozdělují na 2 skupiny podle hlavního produktu, a to na producenty kyseliny mléčné nebo kyseliny fumarové (jablečné). Na obrázku 4 je znázorněna dráha metabolismu glukosy u plísní rodu *Rhizopus*. Dráha ukazuje klíčové body fermentace glukosy na organické kyseliny a ethanol. Toto schéma zahrnuje biosyntézu kyseliny L-mléčné, fumarové a ethanolu. Pyruvát, jako meziprodukt, vede k tvorbě organické kyseliny a vedlejších produktů. Pro produkci těchto metabolitů jsou klíčové následující enzymy: pyruvátdekarboxylasa, pyruvátcarboxylasa, alkoholdehydrogenasa, laktátdehydrogenasa, malátdehydrogenasa a fumarasa. Tyto enzymy určují podíl vznikajících produktů [40].





Obrázek 4: Metabolismus sacharidů u *Rhizopus oryzae* [40]

U plísni byla prokázána přítomnost 3 druhů laktátdehydrogenasy (LDH), a to konkrétně u plísni rodu *Rhizopus*. U tohoto druhu byla prokázána přítomnost jedné NAD-independentní a dvou NAD-dependentních isoenzymů. První NAD<sup>+</sup>-dependentní LDH (LdhA) převádí pyruvát na laktát, ale vykazuje zanedbatelnou aktivitu pro reverzní reakce. K produkci tohoto isoenzymu dochází během počátečního růstu a během produkce kyseliny mléčné. Druhá NAD<sup>+</sup>-dependentní LDH (LdhB) převádí L-laktát na pyruvát a je produkována kulturami rostoucími na nefermentovatelných substrátech, jako je glycerol, ethanol a laktát. Během fermentace může dojít k mírnému poklesu produkce kyseliny mléčné po vyčerpání glukosy a následně opět ke zvýšení hladiny kyseliny mléčné. Tento jev je přisuzován aktivitě LdhB [40].

U plísni byla zkoumána také utilizace pentos na kyselinu mléčnou. Nepodařilo se ji prozkoumat tak, jako utilizaci hexos (např. glukosy). Nicméně respirace a produkce xylitolu, jakožto meziprojektu během utilizace xylosy plísněmi naznačuje, že xylosa je zpracována oxidačně redukční drahou. Tato dráha je pravděpodobně podobná oxidačně redukční dráze vyskytující se u kvasinek využívajících xylosu (např.: *Pichia stiptis*, *Candida shehatae* a *Pachysolen tannophilus*). Tyto kmeny metabolizují xylosu pomocí pentosového cyklu založeného na přeměně xylosy na xylitol pomocí xylosareduktasy. Dále dochází k přeměně xylitolu na xylulosu pomocí xylitoldehydrogenasy, a ta je následně xylulosakinasou přeměněna na xylulosa 5-fosfát, který může být dále metabolizován pomocí Embden-

Meyerhoff-Parnasovy dráhy na pyruvát. Schopnost plísní využít xylosu je důležitá z hlediska možnosti využití lignocelulosových materiálů jako substrátu [40].

### 2.3.3 Přehled producentů kyseliny mléčné

Kyselina mléčná může být produkována mikroorganismy patřícími mezi bakterie, plísně, kvasinky, sinice a řasy. V současnosti se studie přiklání k použití směsných kmenů během fermentace, což může poskytnout užitečné kombinace metabolických drah pro využití komplexních materiálů a následně zvýšení produkce kyseliny mléčné. Pro zvýšení výtěžnosti a optické čistoty kyseliny mléčné produkované různými mikroorganismy je využíváno také genetické inženýrství [13][48].

#### 2.3.3.1 Bakteriální producenti

Bakterie produkující kyselinu mléčnou zahrnují divoké či geneticky modifikované producenty. Mezi bakteriální producenty patří hlavně bakterie mléčného kvašení, rod *Bacillus*, *Escherichia coli* a *Corynebacterium glutamicum*. Bakteriální produkce kyseliny mléčné má několik omezení, a to:

- produkce kyseliny L- i D-mléčné pomocí L-laktátdehydrogenasy a D-laktátdehydrogenasy v daném pořadí;
- nízká výtěžnost v důsledku tvorby vedlejších produktů;
- potřeba nutričně bohatého média;
- vysoké riziko infekce bakteriofágy, která vede k lyzi buněk a následnému zastavení produkce kyseliny mléčné [14].

#### ***Bakterie mléčného kvašení***

Mezi nejčastější producenty kyseliny mléčné patří bakterie mléčného kvašení. Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou tak nazývány vzhledem ke schopnosti produkce kyseliny mléčné jakožto hlavního (někdy jediného) produktu fermentace. Bakterie mléčného kvašení jsou definovány jako chemotrofní mikroorganismy, které vytváří energii (ATP) substrátovou fosforylací. Ačkoliv tyto bakterie fermentují cukry za anaerobních podmínek, mohou také růst za přítomnosti kyslíku. Mnoho těchto bakterií tvoří enzymy potřebné pro aerobní dýchání, ale nesyntetizují hem (některé bakterie mléčného kvašení také postrádají menachinony). Tudíž dýchací řetězec je „nefunkční“, pokud se hem (pro některé bakterie i menachinony) nepřidá do kultivačního média. Většina BMK jsou katalasově negativní, nepohyblivé, nesporulující. Optimální teplotu růstu mají mezi 20 a 45 °C. Mají vysokou odolnost vůči kyselému prostředí (pH <5), čímž mají výhodu oproti jiným bakteriím [13][48][49].

Jedná se o početnou, morfologicky heterogenní skupinu, nejčastěji koky, kromě rodů *Lactobacillus* a *Carnobacterium*, které mají tvar tyčinek. Jde především o grampozitivní,



aerotolerantní nebo anaerobní bakterie, bez běžných anabolických drah. Podle současné taxonomie BMK patří do kmene *Firmicutes*, třída *Bacilli*, druh *Lactobacillales*. Mezi bakterie mléčného kvašení patří především rody: *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, a *Weissella* [13][48] [49].

#### 2.3.3.2 Plísně

Plísně jsou po bakteriích nejrozšířenějšími producenty kyseliny mléčné. Plísně produkující kyselinu mléčnou patří nejčastěji do rodu *Rhizopus* a produkují zejména L(+)isomer. Nejčastěji využívaným producentem rodu *Rhizopus* je *R. oryzae* [51].

Tito producenti mají mnoho výhod ve srovnání s bakteriálními producenty. Jsou to hlavně: amylolytická schopnost, která jim umožňuje utilizaci škrobnatých substrátů bez předchozí sacharifikace; nízké požadavky na živiny a nízké náklady na downstream proces díky jejich vláknitému nebo peletovému růstu, který usnadňuje izolaci produktu z média oproti bakteriím či kvasinkám. Plísňová biomasa tvoří také cenný vedlejší produkt fermentace. Různé morfologické formy růstu plísní (vláknitá forma, myceliové rohože, pelety nebo shluky) mají významný vliv na reologii fermentačního média, dodávání kyslíku a na úroveň produkce kyseliny mléčné. Růst plísní v malých peletách je preferovanou morfologií pro průmyslovou fermentaci, jelikož zvyšuje reologii a přenos hmoty ve fermentačním médiu a může být využito pro dlouhé operace používané v opakované vsádkové fermentaci. Produkce kyseliny mléčné plísněmi má i určitá omezení, a to: možnost produkce vedlejších produktů (ethanol, kyselina fumarová); vyšší požadavky na kyslík a vláknitá forma omezující možnosti míchání, přenosu hmoty a izolace produktu z média [14][41][52].

#### 2.3.3.3 Kvasinky

Jednou z hlavních ekonomických překážek pro komerční produkci kyseliny mléčné je nákladný postup potřebný k oddělení a purifikaci produktu z fermentačního média. Kvasinky získaly v poslední době velkou pozornost jako producenti kyseliny mléčné, protože mohou růst v minerálních médiích, která mohou usnadnit další regeneraci kyseliny mléčné. Navíc kvasinky mají schopnost tolerance pH až 1,5, což umožňuje fermentaci bez nutnosti neutralizace. Takto nízké pH navíc eliminuje regeneraci vysráženého laktátu (laktátu vápenatého), což by vedlo ke snížení nákladů na neutralizační činidla (např. uhličitán vápenatý). Přestože většina divokých kvasinek přirozeně produkuje malé množství kyseliny mléčné, bylo vyvinuto velké úsilí v modifikaci kvasinek pro produkci kyseliny mléčné. Produkci kyseliny mléčné s vyššími výtěžky lze získat částečným nebo úplným nahrazením produkce ethanolu delecí aktivity pyruvátdekarboxylázy a/nebo pyruvátdehydrogenázy [14].

Různé rody kvasinek (*Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Pichia* a *Kluyveromyces*) byly upraveny k produkci kyseliny mléčné. Nedávné pokroky v oblasti kvasinkového inženýrství se soustředily na použití jiných druhů cukrů, než je glukosa či xylosa. Byl vytvořen kmen *Saccharomyces cerevisiae* exprimující gen  $\beta$ -glukosidázy získaný z *Aspergillus aculeatus*, aby kvasinka mohla využívat celobiosu jako substrát. Jsou však nutné další studie zabývající se produkcí kyseliny mléčné z oligosacharidů a polysacharidů prostřednictvím integrace příslušných genů do genomu kmenů kvasinek [14][53].

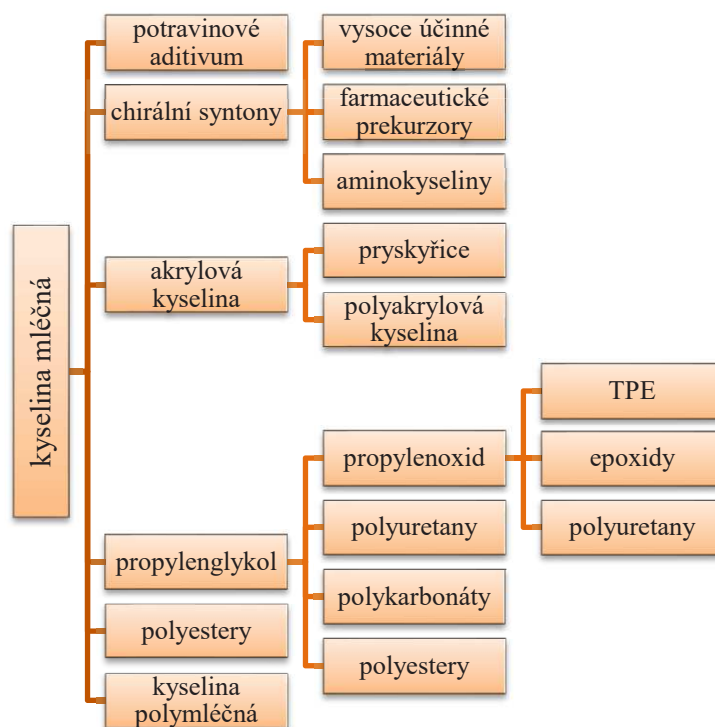
#### 2.3.3.4 Mikrořasy a sinice

Po objevu globálního oteplování vzrůstá zájem o procesy, které spojují zachycování CO<sub>2</sub> s cennou chemickou syntézou za použití fotosyntetických mikroorganismů. Fotosyntetické mikroorganismy (např. řasy a sinice/cyanobakterie) nabízejí alternativní přístup k produkci kyseliny mléčné a umožňují eliminovat náklady na sacharidické suroviny. Některé mikrořasy mají schopnost převést škrob akumulovaný za přítomnosti světla a aerobních podmínek, na organické látky, jako kyselina mléčná, ethanol, kyselina octová a kyselina mravenčí v tmavých a anaerobních podmínkách. Sinice (cyanobakterie) mají několik výhod, zahrnujících jejich fotosyntetické schopnosti, jednoduché vstupní požadavky (zejména sluneční světlo, CO<sub>2</sub> a voda s několika nutnými minerálními živinami), možnost genetického inženýrství, které by mohly být využívány k řešení globálních změn klimatu [14].

#### 2.3.4 Využití kyseliny mléčné

Kyselina mléčná patří mezi univerzální látky s širokým uplatněním. Nejčastější využití nachází např. jako: okyselující přípravek, ochucovadlo a konzervační přípravek v potravinářském průmyslu. Kyselina mléčná nachází široké uplatnění ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Je přidávána do lokálních mastí, pleťových vod, roztoků proti akné, zvlhčovadel, parenterálních roztoků a jako antibakteriální činidlo při dialyzačních aplikacích. Ve formě laktátu vápenatého či hořečnatého se využívá jako doplněk stravy při suplementaci vápníku a hořčíku. Estery kyseliny mléčné, jako je ethyl- nebo butyllaktát mohou být použity jako ekologická rozpouštědla. Další uplatnění nachází například v kožedělném a textilním průmyslu i jako surovina při výrobě chemických sloučenin [41][44] [54].

Nedávno se zvýšil zájem o produkci kyseliny L-mléčné, jelikož by mohla být využita jako monomer pro výrobu kyseliny polymléčné využitelné jako polymer pro lékařské a biologicky rozložitelné plasty šetrné k životnímu prostředí, které mohou nahradit synteticky vyrobené plasty z ropných surovin [55][56].



Obrázek 5: Schéma možností využití kyseliny mléčné [57]

### 2.3.5 Polymery kyseliny mléčné

V současnosti se zvyšuje poptávka po kyselině mléčné pro výrobu kyseliny poly-mléčné (PLA). Tento biopolymer je biologicky odbouratelný, proto je vhodnou ekologickou alternativou plastů získaných z ropných produktů. Polymery kyseliny mléčné jsou biodegradabilní termoplasty. Jsou průhledné a jejich degradaci lze ovládat nastavením složení a molekulové hmotnosti. Jejich vlastnosti se blíží vlastnostem plastů vyrobených z ropných derivátů [13][14][44].

Kyselina poly-mléčná lze použít na výrobu chirurgických stehů, ortopedických implantátů, zásobníků na léky a jednorázových spotřebních výrobků. Poly-(L-mléčná kyselina) s nízkým stupněm polymerace může pomoci při řízeném uvolnění nebo rozkladu kompostové vrstvy pro rozmanité zemědělské účely. Nahrazení plastů produkovaných z ropných produktů plasty vyrobenými z kyseliny mléčné by výrazně zmírnilo problémy s likvidací odpadu [14][44].

## 2.4 Ethanol

Nazývaný také ethylalkohol, alkohol nebo líh. Je kapalina s vodou neomezeně mísitelná, s teplotou varu 78 °C. Má mírné dezinfekční účinky. Fyzikálně jde o bezbarvou kapalinu ostré, ale po zředění příjemné alkoholické vůně. Je snadno zápalný, proto je klasifikován jako hořlavina 1. třídy [58].

### 2.4.1 Výroba

Ethanol se průmyslově vyrábí také dvěma způsoby:

- Chemicky – kyselé katalyzovanou hydratací ethenu
- Biotechnologicky – fermentačním procesem

Z celosvětové produkce ethanolu je 93 % vyrobeno fermentačně a zbylých 7 % se vyrábí chemicky hydratací ethenu [58].

#### 2.4.1.1 Chemická syntéza

Chemicky se ethanol vyrábí přímou katalytickou hydratací ethenu za přítomnosti vodní páry a za použití kyseliny fosforečné adsorbované na povrchu pevné látky (oxidu křemičitého) jako katalyzátoru v reaktoru s pevnou vrstvou. Reakce je exotermní a reverzibilní:



Z rovnovážné rovnice, je zřejmé, že konverze ethenu na ethanol probíhá za nízké teploty, vysokého tlaku a vysoké koncentrace páry [58].

Pro dosažení přijatelných reakčních rychlostí je použita teplota cca 500 K za přítomnosti katalyzátoru. Zvýšení tlaku také posouvá reakci na stranu produktu, avšak také způsobuje polymeraci ethylenu. Vyšší tlak také znamená zvýšení nákladů. V praxi je tento proces provozován při tlaku 60 až 70 MPa. Produkt obsahuje vysoký poměr vody a je destilován na 95 hm % [58].

#### 2.4.1.2 Biotechnologický proces

Ethanol produkovaný fermentační technologií je nazýván bioethanol. Ten nachází nejčastější využití jako biopalivo. Nejčastěji používaným druhem kvasinek pro produkci bioethanolu jsou kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Proces probíhá převážně anaerobně, avšak provzdušnění média na počátku fermentace je příznivé pro nárůst buněk a jejich aktivitu. Kvasinky přímo zkvašují pouze monosacharidy. Polysacharidy je nutno před fermentací hydrolyzovat na monosacharidy pomocí enzymů získaných z jiných mikroorganismů nebo přidáním látek, zpravidla kyselin, které jsou schopny polysacharidy hydrolyzovat [59].

#### 2.4.1.3 Termochemické procesy pro výrobu bioethanolu

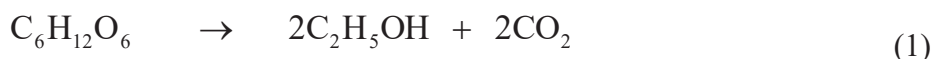
V poslední době je předmětem výzkumu využití termochemických procesů pro výrobu bioethanolu. Existují dva způsoby výroby bioethanolu využívající termochemické reakce. Tyto procesy jsou využívány především v případě použití celulosové biomasy. První proces je ve skutečnosti kombinací termochemického a biologického procesu. Celulosové materiály se

nejprve za tepla zplyňují a syntézní plyn (směs vodíku a oxidu uhličitého) probublává speciálně zkonstruovaným fermentorem. Geneticky modifikované mikroorganismy, které jsou schopny konverze syntézního plynu, jsou zaváděny do fermentačních nádrží za určitých podmínek, které umožňují fermentaci na bioethanol [60].

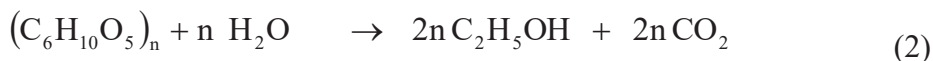
Druhý termochemický proces výroby bioethanolu nevyužívá žádné mikroorganismy. Zde dochází nejprve ke zplynění biomasy a syntézní plyn následně prochází reaktorem obsahujícím katalyzátor převádějící syntézní plyn na bioethanol. Bylo provedeno mnoho pokusů k využití termochemického způsobu výroby bioethanolu v praxi. Výtěžky bioethanolu byly až 50 % za použití tohoto procesu. Některé procesy, které jako první produkují methanol, lze katalyticky posunout na výrobu bioethanolu, dosahují až 80% výtěžků bioethanolu. Bohužel stejně jako ostatní procesy, nalezení nízkonákladového termochemického procesu je poměrně obtížné. Termochemické procesy se zdají být slibnější než biologické pro přeměnu ligninové frakce celulosové biomasy. Tento fakt může mít negativní vliv na enzymatické hydrolýzy, ale slouží také jako zdroj energie procesu a potenciálních vedlejších produktů, které mají významný přínos v životním cyklu [60].

#### 2.4.2 Biochemie ethanolového kvašení

Ethanolové kvašení je proces výroby ethanolu založený na rozkladu sacharidů působením enzymů mikrobiální buňky (většinou se jedná o buňky kvasinek). Tento proces probíhá anaerobně, tedy bez přístupu vzduchu. U kvasinek se však nemusí jednat o striktně anaerobní podmínky. Může být žádané mírné provzdušnění média na počátku fermentace, aby buňky mikroorganismu mírně narostly a zvýšila se jejich aktivita. Rozklad sacharidů je doprovázen uvolňováním energie. Tato energie je z části fixována ve formě ATP a zbytek je přeměněn na teplo. Ethanolovou fermentaci lze popsat Guy-Lussacovou rovnicí [59][61]:



Tato rovnice je i sumárním vyjádřením Embden-Meyerhofovy dráhy (EMP) a vychází z ní, že ze 100 % hm. glukosy vznikne 51,14 % hm. ethanolu a 48,6 % hm. oxidu uhličitého. Guy-Lussacovu rovnici lze upravit i pro stanovení teoretického výtěžku ethanolu z jiných sacharidů. Pro fermentaci zcukřených škrobnatých zápar se uvažuje následující rovnice:



Podle ní lze určit teoretická výtěžnost ethanolu ze škrobu na 56,83 hm. %. Praktická výtěžnost ethanolu se však liší, jelikož dochází ke ztrátám zkvašovaného cukru na růst kvasinek a na tvorbu dalších metabolitů. Kromě ethanolu a oxidu uhličitého vzniká i 6 % vedlejších produktů, kterými jsou vyšší alifatické uhlovodíky, které se nazývají přiboudlina. Zde patří například glycerol, 2,3-butynglykol, acetoin, acetaldehyd, kyselina mravenčí,

octová, mléčná. Přiboudlina vzniká i důsledkem růstu kvasinek, které tvoří i sekundární metabolity. Množství a vznik těchto látek jsou závislé na okolních podmínkách (např.: teplota, množství dusíkatých látek) a charakteristice vybraného druhu kvasinek [61][62].

Nejvýznamnějšími vedlejšími produkty lihového kvašení jsou glycerol a některé organické kyseliny a jejich estery. Tyto vedlejší produkty při výrobě lihu jsou většinou nežádoucí a snažíme se zabránit jejich vzniku. Tvorbu glycerolu lze ovlivnit podmínkami fermentace, jako hodnota pH, obsah siřičitanu, též výběrem kvasinkové kultury. Organické kyseliny většinou vznikají v přítomnosti kyslíku v médiu [61][62].

Kromě ethanolového kvašení vycházejícího z glykolýzy může vzniknout ethanol i drahou nazývanou Entner-Doudoroffova. Tuto metabolickou dráhu využívají bakterie rodu *Zymomonas*. U této dráhy dochází k fosforylaci glukosy na glukosu-6-fosfát. Přebíhá působením glukosa-6-dehydrogenasy na kyselinu 6-P-glukonovou, která je dehydratována na kyselinu 2-keto-3-deoxy-6-P-glukonovou. Ta je účinkem aldolasy štěpena na glyceraldehyd-3-P a kyselinu pyrohroznovou. Obě sloučeniny jsou následně přeměňovány na ethanol a oxid uhličitý, stejně jako při ethanolovém kvašení [61][62].

### 2.4.3 Mikroorganismy

Nejpoužívanějšími producenty ethanolu jsou kvasinky *S. cerevisiae* a bakterie *Zymomonas mobilis*, které jsou schopny kvasit hexosy. Oba tyto mikroorganismy jsou uzpůsobeny pro alkoholové kvašení, mají vysokou toleranci k ethanolu a jsou přístupné genetickým modifikacím. Nejsou však schopny fermentovat pentosy. Momentálně je předmětem výzkumu fermentace xylosy a ostatních pentos na ethanol pomocí kvasinek *Candida shehatae* a *Pichia stipitis*, které nabízí dobrý potenciál i přes nízkou toleranci k ethanolu a inaktivitu při nízkém pH [63]. Bakterie *Pachysolen tannophilus* a *Escherichia coli* mají schopnost fermentovat hexosy i pentosy [63]. *Kluyveromyces marxianus* je termofilní kvasinka s možností růstu při teplotách až 52 °C a je schopna fermentovat široké spektrum cukrů. Vysoká koncentrace cukrů však ovlivňuje konečné výtěžky ethanolu. Její nevýhodou je však nízká tolerance ethanolu a nízké výtěžky během fermentace xylosy [63]. Termofilní bakterie (např. *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermocellum*) jsou přísně anaerobní, odolné vůči velmi vysokým teplotám (až 70 °C). Tyto bakterie mohou fermentovat různé druhy cukrů, mají celulólytickou aktivitu, ale nízkou toleranci vůči ethanolu [58][63].

Dalším předmětem výzkumu v oblasti produkce bioethanolu jsou geneticky modifikované mikroorganismy schopné produkovat vyšší množství celulas, xylanu a hemicelulas. Tyto mikroorganismy by mohly přeměnit zemědělské odpady (např.: kukuřičné píce, slámu, výlisky cukrové třtiny) a energetické plodiny (např.: proso) na fermentovatelné cukry. Vývoj geneticky modifikovaných fermentačních a celulólytických mikroorganismů je vhodný pro



zvýšení výtěžků bioethanolu a produktivity během stresových podmínek doprovázejících produkci větších koncentrací bioethanolu [58][63].

Genetické inženýrství slavilo také úspěch úpravou *S. cerevisiae*, aby byla schopna fermentovat zároveň glukosu a pentosu. Byla zkoumána i modifikovaná *S. cerevisiae* se schopností fermentace různých druhů sacharidů a zároveň s menší produkcí furfuralových inhibitorů. Také *Z. mobilis* zůstává stále v popředí zájmu díky schopnosti vysokých výtěžků ethanolu a odolnosti vůči vysoké teplotě až 40 °C. Byla zavedena řada genů a heterologní exprese u této bakterie, aby se rozšířila její účinnost i na jiné substráty, konkrétně xylosu a arabinosu. Geneticky upravená *Z. mobilis* i *S. cerevisiae* prokázaly vysokou výtěžnost ethanolu a přizpůsobivost. Rozšíření produkce ethanolu pomocí geneticky upravených plísň (např.: *T.reesei* a *Basidiomycetes*) s vhodnými lignocelulolytickými vlastnostmi za nízkého pH a vysokých teplot je také slibným krokem v biokonverzi ethanolu. Některé rody, jako *Candida*, *Pichia* a *Dekkera*, byly izolovány z melasy, nicméně produkovaly nízké koncentrace ethanolu a kyselinu octovou, která je inhibitorem ethanolové fermentace. Některé přírodní druhy divokých kvasinek mají schopnost nahradit *S. cerevisiae* při výrobě druhé generace bioethanolu. Nicméně jejich nevýhodou jsou nízké výtěžky bioethanolu a malá schopnost přežití ve fermentoru, což by potřebovalo další vylepšení [58][63].

K tvorbě ethanolu dochází i u jiných druhů bakterií, avšak zde je pouze jako vedlejší produkt. Ethanol vzniká například při aceton-butanolové fermentaci u bakterií *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus polymyxa* a *Aerobacter indologenes*. Bakterie *Clostridium thermosaccharolyticum* a *Clostridium thermocellum* tvoří z celulosy a hemicelulosy směs laktátu, acetátu a ethanolu. *Bacillus macerans* produkuje ethanol spolu s acetátem, oxidem uhličitým, acetonem a plynným vodíkem [58][63].

#### 2.4.4 Suroviny vhodné k ethanolové fermentaci

Nejčastěji používanou surovinou jsou rostliny obsahující vyšší množství škrobu a sacharidů. Rostliny obsahující pouze šestiuhlíkaté monosacharidy se fermentují přímo. Polysacharidy a oligosacharidy v surovině musí být před fermentací upraveny tak, aby se rozložily na monosacharidy, tento proces se nazývá hydrolýza. Hydrolýza může být enzymatická, alkalická či kyselá, podle druhu substrátu. Ne vždy je nutné k surovině přidat komerční enzym, některé mikroorganismy mají enzymatické vybavení a jsou schopny substrát hydrolyzovat. V poslední době se zvyšuje počet mikroorganismů schopných hydrolýzy vyšších sacharidů díky technikám genového inženýrství. Podle druhu biomasy na výrobu bioethanolu, se může výroba rozdělit do tří skupin:

- výroba z biomasy obsahující jednoduché cukry (např.: cukrová řepa, cukrová třtina),

- výroba z biomasy obsahující škrob (např.: obiloviny, brambory, topinambury),
- výroby z lignocelulosové biomasy (např.: sláma, rychle rostoucí dřeviny, štěpky, odpadní papír) [59][64].

#### **2.4.5 Využití ethanolu**

Použití ethanolu je především ve spalovacích motorech jako pohonná hmota. Vzhledem k vlastnostem ethanolu se v praxi nepoužívá čistý, ale pouze jako přísada do konvenčních minerálních paliv v množství 5 až 10 %. Nízký přídavek bioethanolu do paliva nemění výrazně jeho vlastnosti a není potřeba proto upravovat spalovací motory automobilů. Přídavek ethanolu do paliva zvyšuje oktanové číslo a snižuje množství emisí CO<sub>2</sub> [59][63][64].

Nejznámější použití ethanolu je v potravinářství na výrobu alkoholických nápojů. V lékařství a farmacii se používá jako rozpouštědlo (např. jódu, tím vzniká tzv. jodová tinktura), na extrakci nebo čištění drog/léčivých látek při přípravě některých kapalných přípravků pro vnitřní i vnější použití a k dezinfekci neporaněné kůže. V oblasti kosmetiky se uplatňuje při výrobě deodorantů. Tento alkohol má své místo i při výrobě čisticích prostředků. V chemickém průmyslu se používá jako surovina, zejména při výrobě dalších organických sloučenin: kyseliny octové, ethenu, diethyletheru, ethylacetátu, ethylakrylátu, ethylaminu, diethylaminu, triethylaminu aj. [59][63][64].

### **2.5 Anaerobní digesce**

Anaerobní digesce (AD) je biochemický proces, který přeměňuje celou řadu organických látek s použitím přirozeně se vyskytujících mikroorganismů bez přístupu kyslíku za vzniku plyných směsí. Ty se skládají především z methanu a oxidu uhličitého a označují se jako bioplyn. Anaerobní digesce je používána pro výrobu bioenergie z různých organických surovin, jako jsou lesní a zemědělské zbytky, živočišný hnůj, organický odpad, potravinářský odpad a energetické plodiny. Slouží k výrobě energie z obnovitelných zdrojů, odstraňování odpadů, zmírňování emisí skleníkových plynů a zajištění energetické bezpečnosti. V roce 2013 bylo v Evropě provozováno více než 14 500 komerčních zařízení [65][66][67].

Proces anaerobní digesce je kombinací velkého množství biochemických a fyzikálně-chemických reakcí. Ty mohou být v zásadě kategorizovány jako: dezintegrace, hydrolýza, fermentace (acidogeneze), acetogeneze (tvorba acetátu) a metanogeneze (tvorba methanu) [65].

#### **2.5.1 Produkce organických kyselin s krátkým řetězcem**

Organické kyseliny s krátkým řetězcem bývají také označovány také jako těkavé mastné kyseliny či krátké mastné kyseliny. Tyto kyseliny vznikají jako meziprodukty acidogenního kroku anaerobní digesce a jsou prekurzory pro množství dalších produktů: bioplynu (pomocí



metanogeneze), pohonných látek na bázi alkoholu (např. ethanol a butanol), biologicky rozložitelného plastu (polyhydroxyalkanoáty). Organické kyseliny vyrobené během AD, zejména kyselina octová, může být použita pro výrobu polyvinylacetátu. Dále je lze použít k růstu kvasinek akumulujících lipidy (*Yarrowia lipolytica*), které se dále používají jako surovina pro výrobu bionafty [68][69][70][71].

Produkce organických kyselin s krátkým řetězcem pomocí směsných mikrobiálních kultur vyžaduje potlačení mikroorganismů spotřebovávajících tyto kyseliny, zejména metanogeny. Metanogenezi lze zabránit inhibicí metanogenů chemikáliemi (2-bromethansulfonát, jodpropan), tepelnými šoky či působením kyselin. Všechny tyto způsoby inhibice jsou však problematické z hlediska průmyslového použití a kvůli vyšším provozním nákladům. V případě použití 2-bromethansulfonátu a jodpropanu byl problém při dlouhodobých procesech, poněvadž se na ně mikroorganismy adaptovaly a bylo nutno zvyšovat dávkování. Je tedy potřeba nalézt vhodné metody kontrolující methanogenní aktivitu. Tato metoda by měla být levná a použitelná ve větším měřítku, aby zároveň byla maximalizována produkce organických kyselin. Jako vhodná metoda se nabízí mikroaerace média, která inhibuje striktně anaerobní methanogenní mikroorganismy. Mikroaerace média je jednou z nejšetrnějších metod inhibice striktně anaerobních mikroorganismů k životnímu prostředí [67][68][72][73][74].

### 2.5.2 Mikroaerační metoda

Používání kyslíku v anaerobním procesu vyžaduje definici specifického termínu. Pojem „mikroaerace“ je používán již delší dobu, avšak v průběhu let se jeho použití stalo matoucím vzhledem k tomu, že jej autoři používají v různém kontextu. Pojem „mikroaerace“ je různými autory definován následovně: „použití omezeného množství vzduchu v anaerobním procesu; použití malého množství kyslíku rozpuštěného v médiu; použití kyslíku s nasycením  $< 10\%$   $O_2$ ; použití kyslíku až do určité frakce (10 - 15%) celkového organického zatížení; rozsah rozpuštěného kyslíku, při kterém dochází k optimálnímu růstu mikroaerofilních organismů ( $< 1\ \mu M$ ); režim nízké rychlosti přenosu kyslíku“. Tento pojem lze zjednodušeně definovat jako: "proces, kdy se do základního anaerobního biochemického procesu zavádí určité množství kyslíku, takže zde mohou být současně anaerobní i aerobní biologické aktivity v jednom bioreaktoru" [65].

Byly prokázány pozitivní účinky mikroaerace na snadno degradovatelné substráty za zvýšené produkce organických kyselin s krátkým řetězcem o téměř 330 % po 4 dnech mikroaerace. Pozitivní účinky jsou pravděpodobně způsobeny zvýšenou aktivitou případných hydrolytických a acidogenních mikroorganismů za mikroaerobních podmínek. Bylo zjištěno, že účinnost acidogeneze závisí na stupni okysličování. Některé studie uvádějí pozitivní účinky mikroaerace na hydrolýzu různých substrátů včetně primárního kalu, čerstvých odpadů, potravinových či rostlinných odpadů. Synergický účinek inhibice methanogenů a

podpora růstu fakultativních mikroorganismů mikroaerací by tak mohl účinně zvýšit produkci organických kyselin s krátkým řetězcem [67][72][75][76].

## **2.6 Vybrané analytické metody**

### **2.6.1 Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi-Nelsona**

Metoda je založena na redukci měďnatých iontů ( $\text{Cu}^{2+}$ ) na měďné ( $\text{Cu}^+$ ) pomocí redukujících sacharidů. Tyto ionty jsou obsaženy v tzv. Somogyiho činidle a reakce probíhá v alkalickém prostředí za zvýšení teploty ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Měďné ionty následně redukují arsenomolybdenanový komplex, který se připravuje smícháním molybdenanu amonného  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$  a hydrogenarseničnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_7$ ) za přítomnosti kyseliny sírové a vody. Tento komplex je nazýván Nelsonovým činidlem. Redukcí Nelsonova činidla vzniká modrozelený komplex, jehož koncentrace se určí z měření absorbance při  $540\text{ nm}$  proti slepému vzorku [77].

Tato reakce není stechiometrická a musí být proto stanovena kalibrační křivka sacharidů, které jsou stanovovány nebo D-glukosy. Množství redukujících cukrů je dále vypočteno na základě kalibrační křivky. Za standardních podmínek je přesnost Somogyi-Nelsonovy metody  $\pm 0,01\text{ mg}$  pro D-glukosu, D-galaktosu a maltosu. Nejpřesnějších výsledků je dosaženo, pokud se tato metoda provádí v inertní atmosféře a pokud měřená koncentrace nepřesahuje  $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pokud není k dispozici spektrofotometr, je možno tuto metodu provádět kvalitativně [77][78].

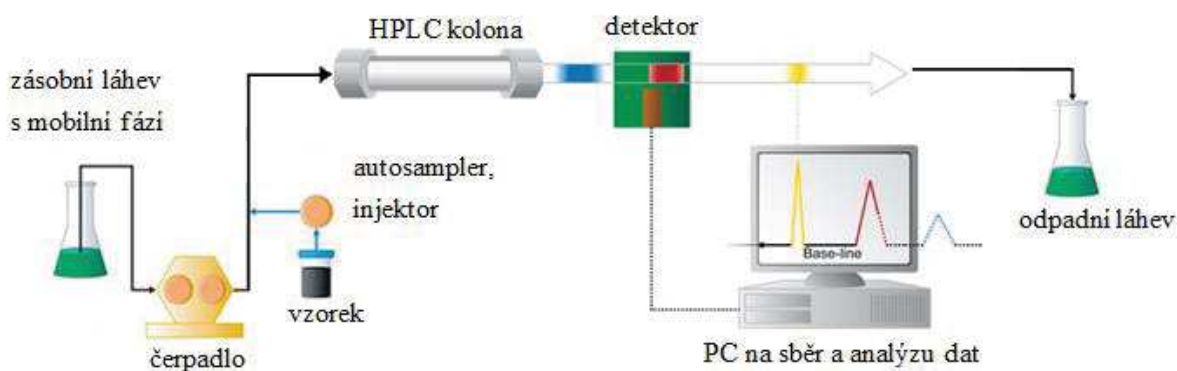
### **2.6.2 Turbidimetrie**

Tato poměrně rychlá a účinná metoda je také využívána pro odhad počtu buněk v tekutém médiu při stanovení velkého počtu kultur najednou. Turbidimetrická měření používají pro kvantifikaci zeslabení záření rozptýleného na velkých částicích veličinu, která se nazývá optická hustota ( $\text{OD} = \text{optical density}$ ). Optická hustota se může přepočítat na množství buněk. Jako slepý vzorek k nastavení 100% transmitance se používá čisté nezaočkované médium. Podle barvy roztoku, resp. média se mohou měnit vlnové délky, a to  $420\text{ nm}$  pro čiré roztoky,  $540\text{ nm}$  pro světle žluté a  $600\text{ až }625\text{ nm}$  pro žluté a hnědé roztoky [79].

### 2.6.3 HPLC

HPLC je zkratkou anglického „High-Performance Liquid Chromatography“, což v překladu znamená vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Tato chromatografická technika slouží k separaci složek vzorku za účelem stanovení přítomnosti a koncentrace daných složek ve vzorku. Může sloužit také k izolaci jednotlivých složek, což se nazývá preparativní chromatografie. Aparatura HPLC se liší od běžné sloupcové zejména přítomností vysokotlakého čerpadla umožňujícího průtok mobilní fáze kolonou o menších rozměrech. V koloně je vázána stacionární fáze na částice s velikostí několik mikrometrů. Dané uspořádání je příčinou vyšší účinnosti separace látek za kratší dobu, oproti klasické sloupcové chromatografii [80][81].

Přítomnost analytů protékajících kolonou je zaznamenávána různými způsoby detekce, a to změnou indexu lomu, UV-VIS absorpce s měnitelnou vlnovou délkou, fluorescence po excitaci vhodnou vlnovou délkou nebo elektrochemickou reakcí. K detekci může být také použita hmotnostní spektrometrie, která může poskytovat kromě detekce separovaných látek i informaci o struktuře oddělených analytů a jejich identifikaci [80][81].



Obrázek 6 - Schématické znázornění HPLC přístroje

### 2.6.4 Stanovení anthokyanů pH-diferenciální metodou

Základy pH-diferenciální metody byly položeny již v roce 1948. Vědci Sondheimer and Kertesz ředstavili koncept určování množství anthokyanů v materiálu měřením změn absorpance při dvou různých hodnotách pH (3,4 a 2,0). Pozdější výzkumy vedly k upřesnění těchto hodnot pH na 1,0 a 4,5 [82].

Vlivem pH dochází u anthokyanových pigmentů k vratným strukturálním přeměnám. Tuto vlastnost je možné využít k vlastnímu měření. Zatímco při pH 1,0 převládá barevná oxoniová forma, při pH 4,5 převládá hemiketalová forma, která je bezbarvá [82].

Měření rozdílu absorbancí probíhá při vlnové délce 510–520 nm, kdy u anthokyanů dochází k maximální absorpci záření. Tento rozdíl absorbancí je úměrný koncentraci monomerního pigmentu. Další měření, při vlnové délce 700 nm, je prováděno z důvodu korekce chyby v měření, způsobené vlivem zákalu. Hodnoty naměřené při této vlnové délce jsou od hodnot naměřených při prvním měření odečítány. Obsah pigmentu je následně spočítán použitím naměřené absorpce při  $\lambda_{\max}$ , molekulové hmotnosti pigmentu a molárního absorpčního koeficientu majoritního anthokyanu v proměřovaném materiálu. Vzhledem k tomu, že anthokyanové polymery nepodléhají změnám zbarvení vlivem pH, nemohou být měřeny touto metodou. Naměřená hodnota koncentrace se proto uvádí jako hodnota koncentrace monomerního pigmentu. Tato metoda pro stanovení anthokyanů je poměrně rychlá a přesná [82][83].

#### **2.6.5 Stanovení celkových fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteua**

Spektrofotometrická metoda stanovení celkových fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla je založena na reakci molybdenanu sodného a wolframanu sodného s fenolickými látkami v alkalickém prostředí. Dochází ke vzniku modře zbarveného komplexu, jehož intenzita lze měřit spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm. Folin-Ciocalteuovo činidlo lze připravit smícháním daných množství wolframanu sodného, molybdenanu sodného, koncentrované kyseliny chlorovodíkové, destilované vody, kyseliny fosforečné a síranu sodného. Principem změny zbarvení je oxidačně-redukční reakce mezi fenolickou skupinou a Folin-Ciocalteuovým činidlem [84][85].

V literatuře věnující se této metodě se poměrně značně liší množství a poměr použitých činidel a vzorku, stejně jako doba, po kterou je nutné nechat látky reagovat. Folin-Ciocalteuova metoda je využívána také pro stanovování aktivity antioxidantů. To souvisí se skutečností, že touto metodou je proměřována schopnost materiálu redukovat Folin-Ciocalteuovo činidlo, což samozřejmě s antioxidačními vlastnostmi souvisí. V tomto ohledu je však přesnější méně používaná metoda přímého měření absorpce vzorku při  $\lambda = 280$  nm. Ta je založena na charakteristické absorpci benzenového jádra, které fenolické látky obsahují a je tedy méně ovlivněná oxidačními vlastnostmi analyzovaného materiálu [86].

#### **2.6.6 FOS/TAC titrační metoda**

Titrační metodou FOS/TAC lze stanovit stabilitu procesu anaerobní degradace a jedná se o indikátor pro hodnocení fermentačních procesů. Výsledkem je hodnota tvořena ze dvou parametrů, a to obsahu organických kyselin s krátkým řetězcem (FOS) a pufovací kapacity (TAC). TAC je zkratka pro celkový anorganický uhlík (základní pufovací kapacita). Stabilita anaerobního procesu může být posouzena buď znalostí jednotlivých parametrů (organické kyseliny a kapacity pufru) nebo vzájemným vztahem těchto parametrů. Pokud je poměr

organických kyselin velmi vysoký (např. větší než 10 g/l), znamená to, že metabolismus je neúplný, což může vést k inhibici procesu. Tento efekt však není tak výrazný, jestliže je současně v systému dostatečná pufrovací kapacita. Podle hydroanalytických parametrů kyselinové a alkalické kapacity a analýz provedených Nordmannem. Titrační metoda, která se dnes používá pro stanovení FOS a TAC i v bioplynových stanicích. Pro výpočty je používána metoda podle Nordmanna [87][88][89].

### 3 Cíle práce

Cílem této disertační práce je sledování využitelnosti vybraných potravinářských odpadních materiálů jako potenciálního zdroje uhlíku pro růst mikroorganismů a s tím související produkci vybraných metabolitů. Součástí práce je také testování mikroaerobní předúpravy lignocelulosového materiálu před anaerobní digescí, které bylo součástí zahraniční stáže na ZHAW (Zurich University of Applied Sciences) ve Švýcarsku.

Cíle práce:

- Výběr a charakterizace vhodného odpadu z potravinářských výrob
- Nalezení vhodné předúpravy odpadního materiálu před fermentací
- Nalezení vhodného mikrobiálního producenta
- Provedení několika fermentací, návrh optimálních podmínek, vyhodnocení výtěžků

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité přístroje a chemikálie

#### 4.1.1 Použité chemikálie

**Stanovení redukujících sacharidů:** kyselina sírová 96% - p.a., Lach-Ner; uhličitan sodný bezvodý, Penta; hydrogenuhličitan sodný, Penta; Seignettova sůl p.a., Lach-Ner; síran sodný p.a., Lach-Ner; pentahydrát síranu měďnatého p.a., Lach-Ner; molybdenan amonný tetrahydrát, MACH; heptahydrát hydrogenarseničnanu sodného, Sigma Aldrich; D-glukóza bezvodá p.a., Penta.

**Standardy:** glukóza bezvodá, p.a., Lach-Ner; galaktóza, Sigma Aldrich; ethanol 99%, Merck; arabinosa, Sigma-Aldrich; kyselina mléčná, Sigma-Aldrich; kyselina citronová, Sigma-Aldrich; kyselina vinná, Sigma-Aldrich; kyselina jablečná, Sigma-Aldrich; kyselina octová, Sigma-Aldrich; kyselina jantarová, Sigma-Aldrich; kyselina gallová, Sigma-Aldrich.

**Kultivační média:** kvasničný extrakt (pro bakteriologii) - Carl Roth; síran amonný p.a., Lach-Ner; dihydrogenfosforečnan draselný p.a. Lach-Ner; síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner; D-glukóza bezvodá p.a., Penta; MRS broth, Himedia; MRS agar powder, VWR; pepton, Carl Roth; agar Powder, Himedia, hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner; laktóza p.a. Lach-Ner; xylosa, Sigma Aldrich; arabinosa, Sigma Aldrich; pektin, Sigma Aldrich; mannosy, Lach-Ner; celobiosa, Sigma Aldrich; galaktosa, Sigma Aldrich; masový extrakt, Carl Roth; citrát diamonný, Lach-Ner; acetát sodný, Lach-Ner; síran manganatý tetrahydrát, Lach-Ner.

**Chemikálie použité k hydrolýze:** Kyselina chlorovodíková 35%, Lach-Ner, Hydroxid sodný, Lach-Ner, Kyselina sírová 96%, Lach-Ner; uhličitan vápenatý, Penta.

**Enzymy:** Viscozyme L celullotic enzyme mixture, Sigma Aldrich; Celuláza z *Trichoderma reesei* (Cellulast 1.5L), Sigma Aldrich;  $\beta$ -glukosidasa (NS50010), Novozymes;  $\alpha$ -amylasa z *Bacillus amyloliquefaciens*, Novozymes; Glukoamylasa z *Aspergillus niger*, Novozymes; Pektinasa z *Aspergillus aculeatus* (Pectinex), Novozymes

**Ostatní chemikálie:** Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta; methanol, VWR; octan sodný, Lach-Ner; chlorid draselný, Lach-Ner; uhličitan sodný, Lach-Ner

#### 4.1.2 Použité mikroorganismy

Vybrané bakteriální kmeny pro produkci kyseliny mléčné byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM), Masarykovy univerzity v Brně. Vybrané kvasinkové kmeny pro produkci ethanolu byly získány z České národní sbírky typových kultur v Praze (CNCTC).

### Produkce kyseliny mléčné

- *Lactobacillus casei* CCM 4798
- *Bacillus coagulans* CCM 2013
- *Bacillus coagulans* CCM 2658
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>
- *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* CCM 7190
- *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>
- *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

### Produkce ethanolu

- *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6646
- *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6651

### Mikroaerobní předúpravy

- směsná anaerobní kultura z čističky odpadních vod (ČOV)

#### **4.1.3 Odpadní substráty**

- Matolína byla získána červených hroznů odrůdy Svatovavřínecké z vinařství Ing. Vlastimil Krčmář, Ždánice
- Pomerančové slupky byly získány ze zralých pomerančů odrůdy Navel z prodejen Lidl
- Kávová sedlina byla získána ze školního kávovaru na FCH VUT v Brně
- Odpadní chléb byl získán z kavárny Zastávka v Brně
- Pšeničné otruby byly získány na ZHAW ve Švýcarsku z místní produkce

#### **4.2 Použité přístroje**

- Spektrofotometr UV-VIS, Helios ε – Unicam (UK)
- Laminární box Aura mini Bioair Instruments (UK)
- Ultrazvuková lázeň Ultrasound (USA)
- Analytické váhy Pioneer™ OHAUS (USA)
- Autokláv, Systec V-95 (Germany)
- Centrifuga Eppendorf 5417 R (Germany)
- Centrifuga Hettich zentrifugen EBA 20 (Germany)
- Bioreaktor New Brunswick BioFlo/CelliGen 115, Eppendorf (Germany)
- Paralelní systém bioreaktorů DASGIP, Eppendorf (Germany)



- Magnetická míchačka, Lavat (Czech Republic)
- Mikrovlnná trouba Daewoo (South Korea)
- Minitřepačka (vortex) Lab dancer vario IKA (Germany)
- Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010 (Germany)
- Termostat Memmert GmbH Co. KG (Germany)
- pH metr InoLab 720, Verkon (Czech Republic)
- Turbidimetr Ultrospec 10 Cell 10 AP (USA)
- Elektrický vařič ETA dvouplotýnkový (Czech Republic)
- Kombinovaná chladnička BOSCH (Germany)
- Váhy elektronické Helago EK-300 (Czech Republic)
- Váhy elektronické OHAUS (USA)
- Dräger X-am 7000 (Germany)
- FOS/TAC automatický titrátor 916 Ti-Touch (Metrohm, Switzerland)
- Bioreaktor ZHAW prototyp (Switzerland)
- Clark Oxygen elektroda pH/ORP elektroda, Transmitter multiparameter M300 – Mettler Toledo (Switzerland)

#### HPLC:

- Sestava HPLC/DAD/RID, Shimadzu LC10 Vyhodnocovací software: CLASS (Japan)
- Sestava HPLC/UV-VIS/RID, ECOM , Vyhodnocovací software: Clarity (Czech Republic)
- Sestava HPLC/DAD/ELSD, Agilent Infinity 1260, Vyhodnocovací software: Agilent chromatography data systém (USA)
- Sestava HPLC/RID, HP (Agilent) 1100, Vyhodnocovací software: Agilent chromatography data systém (USA)
- Sestava HPLC/UV-VIS, Waters 2486, Vyhodnocovací software: Empower Chromatography Data Software (USA)
- Sestava HPLC/RID, Waters 2414, Vyhodnocovací software: Empower Chromatography Data Software (USA)
- Sestava HPLC/DAD/RID, Thermo Fischer scientific – Ultimate 3000 UHPLC system, Vyhodnocovací software: Chromeleon 7.0
- Kolony:
  - Rezex Roa organic acid H<sup>+</sup>, 300 mm x 7,8 mm, Phenomenex company (USA),
  - Polymer IEX H<sup>+</sup> 250 mm x 7,8 mm, Watrex (USA),
  - ICsep ICE-ION-300, 300 x 7,8 mm, Transgenomic (USA),
  - Aminex HPX-87 H, 300 x 7,8 mm, Bio-Rad (USA)

Dále bylo pro práci využito běžné laboratorní sklo a vybavení.

### **4.3 Metody stanovení jednotlivých parametrů**

#### **4.3.1 Stanovení redukujících sacharidů metodou podle Somogyi-Nelsona**

Roztoky pro analýzu byly připraveny následujícím postupem:

*Somogyi I:*

12 g  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 16 g  $\text{NaHCO}_3$  a 18 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody. 144 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (bezvodý) byl pomalu přidáván za stálého míchání do 600 ml teplé destilované vody. Po rozpuštění všech látek byly roztoky smíchány dohromady.

*Somogyi II:*

4 g  $\text{CuSO}_4$  a 36 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (bezvodý) bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody.

*Nelsonův roztok III:*

25 g  $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  bylo rozpuštěno v 450 ml destilované vody, pomalu přidáno 21 ml koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , roztok byl promíchán. Dále bylo přidáno 3 g  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  rozpuštěného v 25 ml destilované vody. Roztok byl smíchán a temperován po dobu 48 hodin v termostatu při 37 °C.

Pro stanovení redukujících sacharidů bylo při každém odběru odebráno 0,5 ml vzorku do 1,5 ml mikrozkušavky. Vzorky byly ihned povařeny ve vroucí vodní lázni po dobu 5 minut pro ukončení reakce (denaturace enzymů). Následně byly vzorky centrifugovány (16000 ot·min<sup>-1</sup> po dobu 10 minut) pro odstranění pevného podílu. Do každé zkumavky bylo pipetováno 0,1 ml Somogyiho činidla (I + II v poměru 4:1) a následně 0,1 ml vhodně naředěného (obvykle 100 - 400x) supernatantu. Zkumavky byly 10 minut povařeny ve vroucí vodní lázni a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Potom bylo do zkumavek přidáno 0,1 ml činidla III a 1 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl promíchán a byla změřena absorbance vzorků proti blanku při vlnové délce 530 nm. Blank obsahoval 0,1 ml destilované vody místo vzorku. Koncentrace redukujících sacharidů ve vzorku byla vypočtena z rovnice regresní přímky získané z kalibrační křivky sestavené pro glukosu.

#### **4.3.2 Analýza sacharidů, alkoholů a organických kyselin metodou HPLC**

Analýza vzorků odebraných během jednotlivých fermentací byla provedena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s RID, DAD a UV/VIS. Touto metodou bylo možné stanovit koncentraci jednotlivých sacharidů a vzniklých produktů (organické kyseliny, ethanol) ve vzorku současně. Bylo odebíráno 1,5 ml vzorku, který byl centrifugován při 16 000 rpm po dobu 10 minut na chlazené centrifuze. Supernatant byl zfiltrován přes 45 µm filtr do vialky. Objem nástřiku vzorku na kolonu byl 10 µl. Analýza probíhala na koloně

určené pro detekci sacharidů, alkoholů a organických kyselin (Polymer IEX H<sup>+</sup>, ICE-ION-300, Aminex HPX-87H, Rezex ROA-H<sup>+</sup>) s izokratickou elucí. Mobilní fáze byla 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, průtok byl nastaven na 0,7 ml·min<sup>-1</sup>. Teplota kolony během analýzy byla 30 °C. K detekci byl použit refraktometrický detektor, kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s využitím příslušných standardů rozpuštěných v destilované vodě a analyzovaných za stejných podmínek jako vzorky.

## 4.4 Charakterizace vybraných substrátů

### 4.4.1 Stanovení anthokyanů pH-diferenciální metodou

Pro stanovení množství celkových anthokynů v matolinách byla použita pH-diferenciální metoda. U této metody je množství anthokyanů v materiálu určováno měřením změn absorbance při dvou různých hodnotách pH (1,0 a 4,5).

Pro analýzu bylo naváženo 25 g vzorku, který byl extrahován v 80 ml 50 hm.% ethanolu. Extrakce probíhala na třepačce za laboratorní teploty po dobu 10 hodin. Extrakt byl dále použit pro analýzu.

Do čtyř zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml naředěného extraktu. Následně bylo do dvou zkumavek napipetováno 2,5 ml 0,4 mol·l<sup>-1</sup> pufru octanu sodného o pH 4,5. Do zbylých dvou zkumavek bylo napipetováno 2,5 ml 0,025 mol·l<sup>-1</sup> pufru chloridu draselného o pH 1. Zkumavky byly promíchány a byla změřena absorbance při vlnových délkách 510 nm a 700 nm. Jako blank bylo použito extrakční činidlo.

Celková koncentrace anthokyanů, vyjádřená jako ekvivalent kyanidu-3-glukosidu (CGE) byla vypočtena z následujícího vzorce:

$$c_{MP} = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l} [\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$$

kde:

$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH4,5}}$

$c_{MP}$ ...výsledná koncentrace monomerního pigmentu ve vzorku [g·l<sup>-1</sup>]

$A$ ...výsledná hodnota absorbance

$M$ ...molekulová hmotnost kyanidin-3-glukosidu (449,2 g·mol<sup>-1</sup>)

$F$ ...faktor ředění

$\varepsilon$ ...molární absorpční koeficient kyanidi-3-glukosidu (26900 l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>)

$l$ ...délka dráhy průchodu světla vzorkem (cm).

Celková koncentrace anthokyanů byla následně přepočtena na obsah anthokyanů ve vzorku v mg na 100 g sušiny.

#### 4.4.2 Stanovení obsahu polyfenolických látek

Ke stanovení celkových polyfenolů bylo použito Folin-Ciocalteuovo činidlo. Fenoly jsou oxidovány v zásaditém prostředí a v činidle přítomné molybdenany a wolframany jsou redukovány na směs modrých oxidů wolframu a molybdenanu. Vzniklé modré zabarvení je úměrné celkovému množství původně přítomných fenolických sloučenin, které je možno stanovit spektrofotometricky při 750 nm. Získané výsledky lze interpretovat jako množství celkových polyfenolů ve vzorku, případně jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE, „Gallic Acid Equivalent“), protože kyselina gallová je zde použita jako standard [90].

Pro sestavení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové o koncentracích v rozmezí 0,1 až 1,0 mg·ml<sup>-1</sup>. Z naměřených hodnot byl následně sestrojen graf kalibrační závislosti, kde  $A = 0,003561 \cdot c + 0,008561$  (mg·ml<sup>-1</sup>).

#### 4.4.3 Stanovení obsahu strukturních sacharidů a vlákniny

Pro stanovení strukturních sacharidů a vlákniny byla použita metoda podle *Sluitera a kol.* [91]. Pro analýzu bylo naváženo 0,300 g ± 0,001 g vzorku do Erlenmeyerových baněk. Dále byly přidány 3 ml 72 hm.% kyseliny sírové. Baňky byly dány na temperovanou třepačku (30 °C, 200 rpm) po dobu 1 hodiny. Následně bylo přidáno 84 ml vody a baňky byly umístěny do autoklávu. Suspenze byla autokláfována 20 minut při teplotě 120 °C. Poté byla suspenze filtrována za sníženého tlaku v porcelánových, předem zvážených filtračních kelímcích. Filtrát byl použit pro analýzu na HPLC. Filtrační koláč byl promyt 200 ml horké vody a poté byl s kelímkem vysušen při 105 °C do konstantní hmotnosti. Kelímky i s vysušeným obsahem byly zváženy a následně umístěny do muflové pece s teplotou 550 °C po dobu 5 hodin. Po zchlazení byly kelímky zváženy a bylo stanoveno množství vlákniny [91].

#### 4.4.4 Stanovení sušiny a množství vody ve vzorku

Pro stanovení sušiny a vlhkosti byly naváženy 3,0000 ± 0,0001 g vzorku do předem zvážených vysušených porcelánových kelímků. Kelímky byly umístěny do sušárny nastavené na 105 °C a vzorek byl sušen do konstantní hmotnosti. Stanovení bylo provedeno ve třech opakováních.

$$\%_{\text{sušina}} = \frac{(m_{\text{kelímek se vzorkem}} - m_{\text{kelímek}})}{m_{\text{vzorek}}} \cdot 100$$

## **4.5 Metody analýzy mikrobiálních produktů**

### **4.5.1 Gravimetrické stanovení biomasy**

Z každé kultivace bylo odebráno 10 ml vzorku, ten byl zcentrifugován 10 minut při 6000 rpm. Supernatant nad sraženinou byl uchován k dalším analýzám a získaný sediment z centrifugace byl promyt destilovanou vodou a znovu zcentrifugován. Získaná biomasa byla sušena do konstantní hmotnosti při teplotě 80 °C. Následně byla gravimetricky stanovena koncentrace biomasy.

### **4.5.2 Stanovení fermentovatelných sacharidů a ethanolu HPLC/RID**

Odebraný vzorek z fermentace byl zcentrifugován. Supernatant byl dále zfiltrován a po příslušném zředění použit pro stanovení koncentrace sacharidů a ethanolu ve vzorku (viz 4.3.2).

### **4.5.3 Stanovení organických kyselin HPLC/UV-VIS**

Odebraný vzorek z fermentace byl zcentrifugován. Supernatant byl dále zfiltrován a po příslušném zředění použit pro stanovení koncentrace organických kyselin ve vzorku (kap. 4.3.2). Organické kyseliny byly detekovány pomocí UV/VIS detektoru, při vlnové délce 210 nm.

## **4.6 Metody optimalizace předúpravy substrátů**

### **4.6.1 Kávová sedlina**

Pro optimalizaci hydrolýz byla použita kávová sedlina, která byla získána z kávovaru umístěného na FCH VUT v Brně. Posbíraná kávová sedlina byla sušena při 80 °C po dobu 24 hodin, aby se předešlo tvorbě plísní a byla snížena vlhkost vzorku.

#### *4.6.1.1 Chemicko-fyzikální hydrolýza*

Pro maximalizaci obsahu fermentovatelných sacharidů byla provedena optimalizace hydrolýzy za různých podmínek. Nejprve byla provedena optimalizace chemicko-fyzikální hydrolýzy přípravou 10 % suspenze kávy a roztoku kyseliny, hydroxidu nebo vody. Pro kyselou hydrolýzu byly připraveny kyseliny o následujících koncentracích: 2 hm.% HCl, 1,35 hm.% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,7 hm.% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Suspenze byla následně autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Byla provedena i alkalická hydrolýza pomocí 5 hm.% NaOH při 70 °C po dobu 3 hodin. Pro porovnání účinku kyselin a hydroxidu byla provedena pouze fyzikální hydrolýza, a to autoklávováním suspenze kávy s destilovanou vodou při 121 °C po dobu 15 minut.

#### 4.6.1.2 Enzymatická hydrolýza

Po zchlazení bylo upraveno pH jednotlivých suspenzí pomocí  $\text{CaCO}_3$  na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolýzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 %  $\beta$ -glukosidasy a 0,4 % Viscozyme L. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolýza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

Byla vyzkoušena i účinnost jednotlivých enzymů na autoklávované suspenzi kávy s 2,7 hm.%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Výtěžky hydrolýz byly stanoveny spektrofotometrickou metodou podle Somogyi-Nelsona a metodou HPLC.

#### 4.6.2 Matoliny

Použité matoliny pro experimenty byly posbírány v regionálním vinařství a následně byly zmrazeny a uchovávány při -18 °C. Pro experimenty byly použity matoliny z révy vinné odrůdy Svatovavřínecké. Před hydrolýzami byly matoliny krátce pomlety v mixéru.

##### 4.6.2.1 Chemicko-fyzikální hydrolýza

Pro maximalizaci obsahu fermentovatelných sacharidů byla provedena optimalizace hydrolýzy za různých podmínek. Nejprve byla provedena optimalizace chemicko-fyzikální hydrolýzy přípravou 15% suspenze matoliny a roztoku kyseliny a hydroxidu. Pro kyselou hydrolýzu byly připraveny kyseliny o následujících koncentracích: 2 hm.% HCl, 2,7 hm.%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Suspenze byla následně autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Byla provedena i alkalická hydrolýza pomocí 5 hm.% NaOH při 70 °C po dobu 3 hodin. Pro porovnání účinku kyselin a hydroxidu byla provedena pouze fyzikální hydrolýza, a to autoklávováním suspenze kávy s destilovanou vodou při 121 °C po dobu 15 minut.

##### 4.6.2.2 Enzymatická hydrolýza

Po zchlazení bylo upraveno pH jednotlivých suspenzí pomocí  $\text{CaCO}_3$  na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolýzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 %  $\beta$ -glukosidasy. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolýza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

Byla vyzkoušena i účinnost jednotlivých enzymů a jejich kombinace na autoklávované suspenzi kávy s 2,7 hm.%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 2 hm.% HCl. Při optimalizaci enzymatické hydrolýzy byly použity následující enzymy a množství: 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 %  $\beta$ -glukosidasy; 0,4 % Viscozyme L; 0,4 % Pectinex. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Výtěžky hydrolýz byly stanoveny spektrofotometrickou metodou podle Somogyi-Nelsona a metodou HPLC.

### 4.6.3 Pomerančové slupky

Pomerančové slupky byly sbírány z pomerančů zakoupených v obchodě. Pro experimenty byly použity slupky z pomerančů odrůdy Navel. Pro experimenty byly použity zmražené slupky uchovávané při teplotě -18 °C. Před hydrolýzami byly pomerančové slupky rozemlety v mixéru.

#### Chemicko-fyzikální hydrolýza

Pro maximalizaci obsahu fermentovatelných sacharidů byla provedena optimalizace hydrolýzy za různých podmínek. Nejprve byla provedena optimalizace chemicko-fyzikální hydrolýzy přípravou 25% suspenze pomerančových slupek a roztoku kyseliny nebo hydroxidu. Pro kyselou hydrolýzu byly připraveny kyseliny o následujících koncentracích: 2 hm.% HCl, 2,7 hm.% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Suspenze byla následně autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Byla provedena i alkalická hydrolýza pomocí 5 hm.% NaOH při 70 °C po dobu 3 hodin. Pro porovnání účinku kyselin a hydroxidu byla provedena pouze fyzikální hydrolýza, a to autoklávováním suspenze kávy s destilovanou vodou při 121 °C po dobu 15 minut.

#### 4.6.3.1 Enzymatická hydrolýza

Po zchlazení bylo upraveno pH jednotlivých suspenzí pomocí CaCO<sub>3</sub> na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolýzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % β-glukosidasy. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolýza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

Byla vyzkoušena i účinnost jednotlivých enzymů a jejich kombinace na autoklávované suspenzi kávy s 2,7 hm.% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2 hm.% HCl. Při optimalizaci enzymatické hydrolýzy byly použity následující enzymy a množství: 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % β-glukosidasa; 0,4 % Viscozyme L; 0,4 % Pectinex. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Výťažky hydrolýz byly stanoveny spektrofotometrickou metodou podle Somogyi-Nelsona a metodou HPLC.

## 4.7 Metody předúpravy substrátů před fermentací

Pro produkci kyseliny mléčné a ethanolu z odpadních substrátů bylo nutno vybrané substráty předupravit, aby došlo ke zvýšení obsahu zfermentovatelných sacharidů v médiu. Pro předúpravu bylo využito chemických a enzymatických hydrolýz.

### 4.7.1 Káвовá sedlina

Byla vytvořena 10% suspenze kávy s 2,7 obj.% kyselinou sírovou. Tato suspenze byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchlazení bylo upraveno pH suspenze, pomocí CaCO<sub>3</sub>, na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou



hydrolýzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 %  $\beta$ -glukosidasy a 0,4 % Viscozyme L. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolýza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

#### **4.7.2 Pomerančové slupky**

Před hydrolýzou byly pomerančové slupky pomlety v mixéru a následně byly podrobeny hydrolýze. Byla vytvořena 25% suspenze pomerančových slupek s 2,7 obj.% kyselinou sírovou. Tato suspenze byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí bylo upraveno pH suspenze, pomocí  $\text{CaCO}_3$ , na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolýzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 %  $\beta$ -glukosidasy, 0,4% Pectinexu a 0,4 % Viscozyme L. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolýza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

#### **4.7.3 Matoliny**

Byla vytvořena 15% suspenze matolin s 2,7 obj.% kyselinou sírovou. Tato suspenze byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí bylo upraveno pH suspenze pomocí  $\text{CaCO}_3$  na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolýzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % Pectinex a 0,4 % Viscozyme L. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolýza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

#### **4.7.4 Pečivo**

Byla vytvořena 15% suspenze rozemletého odpadního chleba s destilovanou vodou. Pro enzymatickou hydrolýzu byly aplikovány postupně 2 enzymy. Jako první bylo přidáno 4 %  $\alpha$ -amylasy a po 2 hodinách působení bylo přidáno 4 % amyloglukosidasy. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolýza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 65 °C s třepáním 150 rpm. Celkový čas enzymatické hydrolýzy byl 3,5 hodiny.

## 4.8 Kultivace mikroorganismů

### 4.8.1 Příprava kultivačních médií a inokula

#### 4.8.1.1 Mikroorganismy produkující kyselinu mléčnou

##### Inokulum

Pro přípravu inokula bylo použito MRS médium, které bylo sterilizováno autoklávováním při 121 °C po dobu 15 minut. Médium bylo vytemperováno na 37 °C a následně bylo napipetováno 10 ml média do sterilních zkumavek. Do takto připravených zkumavek bylo přidáno 100 µl rozmražené kultury. Kultivace probíhala po dobu 48 hodin při 37 °C.

Inokula pro produkci kyseliny mléčné byla připravena zaočkováním sterilního MRS média z rozkultivovaných zkumavek v poměru 1:9. Kultivace inokula pro produkční médium trvala 18 hodin.

##### složení MRS média:

Pepton	10,0 g·l <sup>-1</sup>
Masový extrakt	10,0 g·l <sup>-1</sup>
Kvasničný extrakt	5,0 g·l <sup>-1</sup>
Glukosa	20,0 g·l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g·l <sup>-1</sup>
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na·3H <sub>2</sub> O	5,0 g·l <sup>-1</sup>
Citrát diamonný	2,0 g·l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g·l <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05 g·l <sup>-1</sup>

#### 4.8.1.2 Mikroorganismy produkující ethanol

Médium obsahující agar bylo po sterilizaci (121 °C po dobu 15 minut) nalito na Petriho misky. Na tuhé agarové plotny byl následně křížovým roztěrem zaočkován příslušný kmen, po 48 hodinách temperace při 30 °C v termostatu byly agarové plotny uchovávány při teplotě 4 °C v lednici.

Inokulum pro produkční médium bylo připraveno převedením z agarových ploten pomocí sterilní kličky do sterilního tekutého média. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C a míchání 150 rpm.

složení tuhého média:

kvasničný extrakt	5 g·l <sup>-1</sup>
pepton	5 g·l <sup>-1</sup>
glukosa	10 g·l <sup>-1</sup>
agar	20 g·l <sup>-1</sup>

složení tekutého média:

kvasničný extrakt	5 g·l <sup>-1</sup>
pepton	5 g·l <sup>-1</sup>
glukosa	10 g·l <sup>-1</sup>

## 4.9 Produkce kyseliny mléčné

### 4.9.1 Screening růstu mikroorganismů na různých sacharidech

Byly provedeny kultivace vybraných mikroorganismů na MRS médiu obsahujícím různé sacharidy namísto glukosy, aby byla zjištěna produktivita kyseliny mléčné na jednotlivých sacharidech. Tyto sacharidy byly vybrány, jakožto nejčastěji se vyskytující v odpadech z potravinářských výrob a jejich hydrolyzátech.

Byla připravena média o objemu 40 ml s obsahem jednotlivých sacharidů, které bylo zaočkováno 10 ml 18hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Pro screening byli použiti producenti kyseliny mléčné uvedení v kapitole 4.1.2. Kultivace byla ponechána po dobu 48 hodin. Na počátku a na konci kultivace byla změřena optická hustota. Po skončení kultivace byla změřena koncentrace vzniklé kyseliny mléčné metodou HPLC (viz 4.3.2).

složení kultivačního média:

Sacharid*	20,0 g·l <sup>-1</sup>
Pepton	10,0 g·l <sup>-1</sup>
Masový extrakt	10,0 g·l <sup>-1</sup>
Kvasničný extrakt	5,0 g·l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g·l <sup>-1</sup>
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na·3H <sub>2</sub> O	5,0 g·l <sup>-1</sup>
Citrát diamonný	2,0 g·l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g·l <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05 g·l <sup>-1</sup>

\* glukosa, xylosa, mannosy, arabinosa, celobiosa, galaktosa, pektin a laktosa.

#### 4.9.2 Screening růstu mikroorganismů na hydrolyzátech

Byly provedeny kultivace mikroorganismů na hydrolyzátech vybraných substrátů pro nalezení nejvhodnějšího producenta kyseliny mléčné. Produkce kyseliny mléčné probíhala na hydrolyzátech bez úpravy pH a s upraveným pH na hodnotu 7.

Bylo připraveno 100 ml hydrolyzátů kávových sedlin, matolin, pomerančových slupek a odpadního chleba podle postupů uvedených v kapitole 4.7. Následně bylo u části hydrolyzátů upraveno pH na hodnotu 7 pomocí  $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  NaOH a u druhé části hydrolyzátů nebylo pH upraveno.

Hydrolyzáty byly zakultivovány 10 % 18 hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Pro fermentace jednotlivých hydrolyzátů byli použiti producenti kyseliny mléčné uvedení v kapitole 4.1.2. Kultivace byla ponechána po dobu 48 hodin. Po skončení kultivace byla změřena koncentrace vzniklé kyseliny mléčné metodou HPLC (viz 4.3.2).

#### 4.9.3 Produkce kyseliny mléčné v bioreaktoru

Byly provedeny kultivace vybraných mikroorganismů na jednotlivých hydrolyzátech v bioreaktoru pro maximalizaci výtěžků kyseliny mléčné.

##### 4.9.3.1 Fermentace na hydrolyzátu matolin

Pro produkci kyseliny mléčné v bioreaktoru byla vybrána bakterie *Lbc. rhamnosus* CCM 1825. Pro fermentace bylo připraveno 4 l hydrolyzátu matolin (viz 4.7.3), který byl přefiltrován za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce. Filtrát zhydrolyzovaných matolin obohacený o přídavek  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  kvasničného extraktu byl použit jako médium. Předem vysterilizovaný bioreaktor BioFlo/CelliGen 115 s fermentační nádobou o objemu 2 l byl naplněn 1,5 l média a byl zaočkován 10 % 18 hodinového inokula. Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty  $37^\circ\text{C}$ , míchání 100 rpm a pH bylo upravováno na hodnotu 6,5 pomocí  $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  NaOH. Fermentace probíhala po dobu 72 hodin.

Během fermentace bylo odebíráno v intervalu 24 hodin 10 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Sediment byl použit pro gravimetrické stanovení množství biomasy (viz 4.5.1) a supernatant byl použit pro analýzu metodou HPLC (viz 4.3.2). Průběh fermentace byl monitorován softwarem Biocommand (Eppendorf, Germany). Fermentace v bioreaktoru byla provedena ve 2 opakováních.

##### 4.9.3.2 Fermentace na hydrolyzátu pomerančových slupek

Pro fermentaci v bioreaktoru byly připraveny 4 l hydrolyzátu pomerančových slupek (viz 4.7.2), který byl přefiltrován za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce. Bioreaktor BioFlo/CelliGen 115 s fermentační nádobou o objemu 2 l byl naplněn 1,5 l filtrátu hydrolyzátu s přídavkem  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  kvasničného extraktu. Bioreaktor byl následně zaočkován

10 % 18 hodinového inokula. Pro produkci kyseliny mléčné v bioreaktoru byla vybrána bakterie *Lbc. rhamnosus* CCM 1825. Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty 37 °C, míchání 100 rpm. V průběhu fermentace bylo pH upravováno na hodnotu 6,5 pomocí 5 mol·l<sup>-1</sup> NaOH. Fermentace probíhala po dobu 72 hodin.

Během fermentace bylo odebíráno v intervalu 24 hodin 10 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Sediment byl použit pro gravimetrické stanovení množství biomasy (viz 4.5.1) a supernatant byl použit pro analýzu metodou HPLC (viz 4.3.2). Průběh fermentace (pH, DO, množství neutralizačního činidla) byl monitorován softwarem Biocommand (Eppendorf, Germany). Fermentace v bioreaktoru byla provedena ve 2 opakováních.

#### 4.9.3.3 *Fermentace na hydrolyzátu odpadního chleba*

Před fermentacemi v bioreaktoru byly připraveny 4 l hydrolyzátu odpadního chleba (viz 4.7.4), který byl zcentrifugován a supernatant byl použit pro fermentace. Vysterilizovaný bioreaktor BioFlo/CelliGen 115 s fermentační nádobou o objemu 2 l byl naplněn 1,5 l zcentrifugovaného hydrolyzátu a byl zaočkován 10 % 18-hodinového inokula. Pro produkci kyseliny mléčné v bioreaktoru byla vybrána bakterie *Lbc. rhamnosus* CCM 1825. Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty 37 °C, míchání 100 rpm, pH bylo upravováno na hodnotu 6,5 pomocí 5 mol·l<sup>-1</sup> NaOH. Fermentace probíhala po dobu 76 hodin.

Během fermentace bylo odebíráno v intervalu 24 hodin 10 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Sediment byl použit pro gravimetrické stanovení množství biomasy (viz 4.5.1) a supernatant byl použit pro analýzu metodou HPLC (viz 4.3.2). Průběh fermentace byl monitorován softwarem Biocommand® (Eppendorf, Německo). Fermentace v bioreaktoru byla provedena ve 2 opakováních.

#### 4.9.3.4 *Fermentace na hydrolyzátu kávové sedliny*

Bylo provedeno několik fermentací hydrolyzátu kávové sedliny za použití několika druhů bakterií. Část experimentů byla provedena v rámci zahraniční stáže v Rakousku.

Během stáže v Rakousku bylo provedeno několik fermentací v paralelním systému bioreaktorů DASGIP (Eppendorf, Německo). Tento systém se skládal ze 4 nádob o objemu 1 l. Pro kultivace byly bioreaktory naplněny 750 ml média. Pro kultivace v bioreaktoru byl jako médium využit hydrolyzát kávové sedliny, hydrolyzát kávové sedliny s přidavkem 3 g·l<sup>-1</sup> kvasničného extraktu a MRS médium s obsahem sacharidů podobným hydrolyzátu kávové sedliny (6,75 g l<sup>-1</sup> glukosy, 19,5 g l<sup>-1</sup> galaktosy a 2,25 g l<sup>-1</sup> arabinosy). Byly připraveny 3 l hydrolyzátu kávových sedlin (viz 4.7.1), které byly před kultivacemi přefiltrovány. Pro tyto experimenty byl použit jako producent kyseliny mléčné *Lbc. rhamnosus* CCM 1825. Bioreaktory byly zakultivovány 50 ml 18 hodinového inokula. Fermentace v bioreaktoru

probíhala za teploty 37 °C, míchání 100 rpm. V průběhu fermentace bylo pH upravováno na hodnotu 6,5 pomocí 5 mol·l<sup>-1</sup> NaOH. Fermentace probíhala po dobu 92 hodin.

Během fermentace bylo odebíráno v intervalu 24 hodin 10 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Sediment byl použit pro gravimetrické stanovení množství biomasy (viz 4.5.1) a supernatant byl použit pro analýzu metodou HPLC (viz 4.3.2). Průběh fermentace byl monitorován softwarem DASware® Control (Eppendorf, Německo). Fermentace v bioreaktoru byla provedena ve 2 opakováních.

Byly provedeny další experimenty zabývající se produkcí kyseliny mléčné v bioreaktoru. Tyto experimenty již byly prováděny v bioreaktoru BioFlo/CelliGen 115 Pro tyto experimenty byly vybrány bakterie *Lbc. plantarum* CCM 7039 a *Bacillus coagulans* CCM 2658. Před kultivací v bioreaktoru bylo připraveno 7 l hydrolyzátu kávových sedlin (viz 4.7.1), který byl přefiltrován za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce. Bioreaktor o objemu 2 l byl naplněn 1,5 l filtrátu hydrolyzátu s přidavkem 3 g·l<sup>-1</sup>. Poté byl zaočkován 10 % 18 hodinového inokula. Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty 37 °C, míchání 100 rpm. V průběhu fermentace bylo pH upravováno na hodnotu 6,5 pomocí 5 mol·l<sup>-1</sup> NaOH. Fermentace probíhala po dobu 72 hodin.

Během fermentace bylo odebíráno v intervalu 24 hodin 10 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Sediment byl použit pro gravimetrické stanovení množství biomasy (viz 4.5.1) a supernatant byl použit pro analýzu metodou HPLC (viz 4.3.2). Průběh fermentace byl monitorován softwarem Biocommand® (Eppendorf, Německo). Fermentace v bioreaktoru byla provedena ve 2 opakováních.

## **4.10 Produkce ethanolu**

### **4.10.1 Produkce ethanolu na hydrolyzátech vybraných odpadů**

Byly provedeny kultivace na vybraných hydrolyzátech za účelem produkce ethanolu. Pro produkci ethanolu na jednotlivých hydrolyzátech byly vybrány dva kmeny kvasinek z rodu *S. cerevisiae* (viz 4.1.2)

Pro fermentaci bylo připraveno 100 ml hydrolyzátů kávových sedlin, matolin a pomerančových slupek podle postupů uvedených v kapitole 4.7. Před fermentací bylo upraveno pH hydrolyzátů na hodnotu 6,0 pomocí 5 mol·l<sup>-1</sup> NaOH. Takto připravené hydrolyzáty byly zakultivovány 10 % 24 hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Pro fermentace jednotlivých hydrolyzátů byli použiti producenti ethanolu uvedení v kapitole 4.1.2. Kultivace byla ponechána po dobu 72 hodin. Po skončení kultivace byla změřena koncentrace vzniklého ethanolu metodou HPLC (viz 4.3.2).

#### 4.10.2 Produkce ethanolu v bioreaktoru

Pro produkci ethanolu v bioreaktoru byla vybrána kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6646. Jako substrát byl vybrán hydrolyzát kávové sedliny s přidavkem  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  kvasničného extraktu. Výběr kmene a substrátu souvisel s výsledky z experimentů provedených v předešlé kapitole.

Byly připraveny 4 l hydrolyzátu kávové sedliny (viz 4.7.1), který byl přefiltrován za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce. Sterilní bioreaktor BioFlo/CelliGen 115 s fermentační nádobou o objemu 2 l byl naplněn 1,5 l zfiltrovaného hydrolyzátu a byl zaočkován 10 % 18 hodinového inokula. Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty  $30^\circ\text{C}$ , míchání 100 rpm, pH bylo upravováno na hodnotu 5,5 pomocí  $5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH. Fermentace probíhala po dobu 72 hodin.

Během fermentace bylo odebíráno v intervalu 24 hodin 10 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Sediment byl použit pro gravimetrické stanovení množství biomasy a supernatant byl použit pro analýzu metodou HPLC (viz 4.3.2). Průběh fermentace byl monitorován softwarem Biocommand (Eppendorf, Germany). Fermentace v bioreaktoru byla provedena ve 2 opakováních.

#### 4.11 Mikroaerobní předúpravy

Byla studována závislost vlivu množství kyslíku na chování mikroorganismů vyskytujících se v odpadním anaerobním kalu z čističky odpadních vod. Pro účely zkoumání byl zkonstruován prototyp bioreaktoru s nádobou o objemu 7 l. Postupně bylo provedeno několik vsádkových fermentací s různými režimy vzdušnění. Dále byly provedeny i přítokované a kontinuální způsoby fermentací. Všechny experimenty byly z časových důvodů provedeny bez opakování. Tato kapitola byla naměřena v rámci zahraniční stáže na ZHAW (Zurich University of Applied Sciences) ve Švýcarsku.

##### 4.11.1 Produkce organických kyselin v bioreaktoru

Pro produkci organických kyselin za mikroaerobních podmínek byly použity jako substrát otruby z pšenice špaldy a jako inokulum sloužila směsná kultura mikroorganismů obsažená v anaerobním kalu získaném z čističky odpadních vod ve Wädenswilu (Švýcarsko). Byla vytvořena 1 hm.% suspenze otrub a odpadního kalu (60 g otrub do 6 l kalu). Během všech fermentací v bioreaktoru bylo stanovováno množství a složení vznikajících plynů nad médiem, hodnoty FOS a TAC pro zjištění účinnosti procesu acidogeneze a množství vznikajících organických kyselin metodou HPLC. Během fermentace byly také snímány hodnoty pH, kyslíku a redoxního potenciálu.



#### 4.11.1.1 Vsádková fermentace

Byly provedeny 4 vsádkové kultivace s různými intervaly vzdušnění. Před fermentacemi byl nastaven průtok vzduchu na 1 V, což odpovídalo množství  $46,57 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  vzduchu  $\sim 0,44 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ O}_2$ . Teplota v bioreaktoru byla nastavena na  $35^\circ\text{C}$ . Kultivace probíhaly za následujících podmínek:

- Batch 1 – míchání: 500 rpm; interval vzdušnění: 4 minuty pauza a 30 s vzdušnění; doba fermentace: 72 hodin
- Batch 2 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 2 minuty pauza a 120 s vzdušnění; doba fermentace: 72 hodin
- Batch 3 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 8 minut pauza a 30 s vzdušnění; doba fermentace: 96 hodin
- Batch 4 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění; doba fermentace: 144 hodin

Během každé fermentace bylo odebíráno 30 ml vzorku ve 24 hodinovém intervalu.

#### 4.11.1.2 Přítokovaná (fed-batch) fermentace

Byly provedeny 2 přítokované kultivace s různými intervaly vzdušnění. Před fermentací byl nastaven průtok vzduchu na 1 V, což odpovídalo množství  $46,57 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  vzduchu  $\sim 0,44 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ O}_2$ . Teplota v bioreaktoru byla nastavena na  $35^\circ\text{C}$ . Kultivace probíhaly za následujících podmínek:

- Fed-batch 5 – míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 2 minuty pauza a 120 s vzdušnění;
- Fed-batch 6 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění;

Přítokovaná fermentace probíhala tak, že po 65 hodinách kultivace 1 hm.% suspenze otrub a odpadního kalu (60 g otrub do 6 l kalu) bylo přidáno 400 ml suspenze kalu s přídatkem 60 g otrub. Během každé fermentace bylo odebíráno 30 ml vzorku ve 24 hodinovém intervalu.

#### 4.11.1.3 .Semi-kontinuální a kontinuální fermentace

Byly provedeny dvě kontinuální a jedna semi-kontinuální kultivace. Před fermentacemi byl nastaven průtok vzduchu na 1 V, což odpovídalo množství  $46,57 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  vzduchu  $\sim 0,44 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ O}_2$ . Teplota v bioreaktoru byla nastavena na  $35^\circ\text{C}$ . Kultivace probíhaly za následujících podmínek:

- Semi-kontinuální 7 – míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění; dávkování substrátu: každých 24h 2 l kalu s 20 g otrub

- Kontinuální 8 – míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění; dávkování substrátu: 3 x denně 667 ml kalu s 1 hm.% otrub
- Kontinuální 9 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění; dávkování substrátu: 6 x denně 667 ml kalu s 1 hm.% otrub

Všechny fermentace probíhaly po dobu 6 dní. Během každé fermentace bylo odebíráno 30 ml vzorku ve 24 hodinovém intervalu.

Semikontinuální fermentace probíhala manuálním odebráním 2 l zfermentované suspenze v bioreaktoru a doplněním 2 l čerstvé suspenze kalu s otrubami. Kontinuální fermentace již probíhaly pomocí systému 2 bioreaktorů. Pro přidávání čerstvého substrátu byl použit reaktor o objemu 12 l, který byl naplněn 1 hm.% suspenzí kalu a otrub. Tento reaktor byl míchán a umístěn v lednici při 6 °C. Kontinuální fermentace s označením 7 byla prováděna vypuštěním a následným napuštěním 667 ml suspenze 3krát denně, což odpovídalo 2 l média denně. Kontinuální fermentace s označením 8 byla prováděna vypuštěním a následným napuštěním 667 ml suspenze 6krát denně, což odpovídalo 4 l média denně.

#### **4.11.2 Stanovení poměru organických kyselin a pufruční aktivity metodou FOS/TAC**

Odebrané vzorky z bioreaktoru byly zcentrifugovány při 9000 rpm po dobu 10 minut a supernatant byl použit pro stanovení na automatickém titrátoru. Do kádinky bylo napipetováno 10 ml supernatantu a zředěno destilovanou vodou na 60 ml. Do roztoku byla ponořena pH elektroda s míchadlem a hadička vycházející ze zásobníku obsahujícího 0,2 mol·l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po zapnutí analýzy již titrátor automaticky dával kyselinu v závislosti na pH roztoku a stanovil hodnoty FOS a TAC, které následně byly odečteny z displeje přístroje.



*Obrázek 7: automatický titrátor Metrohm Ti-touch 916*

#### 4.11.3 Stanovení koncentrace plynů

Během fermentace byla v 24 hodinových intervalech stanovována koncentrace plynů nad médiem v bioreaktoru. Plyny byly stanovovány pomocí přístroje Dräger X-am 7000 (Germany), který byl kalibrován pro stanovení množství  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{O}_2$  a  $\text{N}_2$ .

Pro změření koncentrace jednotlivých plynů byl přístroj připojen k hadičce vycházející z bioreaktoru. Byl ponechán po dobu 5 minut nasávat plyny z volného prostoru v bioreaktoru a poté byly zapsány hodnoty jednotlivých plynů z displeje přístroje.



Obrázek 8: Dräger X-am 7000

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Charakterizace jednotlivých substrátů

Byly provedeny charakterizace jednotlivých substrátů, které byly vybrány pro studium možnosti produkce kyseliny mléčné a ethanolu. Stanoveno bylo především množství fermentovatelných sacharidů a množství sušiny (vlhkosti) v jednotlivých odpadech. Dále byla provedena stanovení látek obsažených v jednotlivých odpadech, jejichž přítomnost by mohla ovlivnit následnou fermentaci vybranými mikroorganismy. Použité metody pro tato stanovení jsou popsány v kapitole 4.4.

#### 5.1.1 Složení kávové sedliny

V kávové sedlině získané z univerzitního kávovaru bylo stanovováno krom strukturních sacharidů i celkové množství polyfenolických látek a případně dalších možných inhibitorů jako například 5-hydroxy-methyl-furfural (HMF). Naměřené hodnoty jsou vztaženy na množství sušiny a shrnuty v Tabulce 1.

*Tabulka 1: Složení kávové sedliny*

	Množství (g na 100 g sušiny)
glukosa	10,01 ± 0,16
galaktosa + mannosu	39,62 ± 0,66
arabinosa	3,39 ± 0,68
glycerol	0,27 ± 0,10
diacetyl	0,82 ± 0,20
kyselina levulová	0,14 ± 0,02
2 - propanol	0,06 ± 0,01
5-hydroxy-methyl-furfural	0,24 ± 0,02
furfural	0,09 ± 0,01
polyfenoly	5,78 ± 0,01
vláknina	1,64 ± 0,22
množství sušiny	95,11 ± 0,14 %

Výsledky analýzy kávové sedliny jsou porovnatelné s hodnotami uvedenými v publikacích od Petrik a kol. 2014 a Ballesteros a kol. 2014, které se věnují problematice složení kávové sedliny [92][93]. Jediným rozdílem je, že autoři uvádí ve složení galaktosu a manosu, zatímco námi použitou metodou byla stanovena pouze galaktosa. Součet stanovených množství galaktosy a manosy uvedených v těchto publikacích však odpovídá námi naměřené hodnotě pro galaktosu. Bylo zjištěno, že použitá kolona pro HPLC nebyla schopna odseparovat tyto dva sacharidy. Vzhledem k tomu, že galaktosa a manosa mají stejný retenční čas, byla stanovena pouze celková koncentrace obou sacharidů v jednom píku. V tabulce je tedy

uvedeno množství těchto sacharidů jako suma. Stanovení jednotlivých koncentrací galaktosy a manosy však nebylo nutné, jelikož oba tyto sacharidy jsou fermentovatelné [92][93].

Důležitým faktem je, že kávová sedlina obsahuje, ve srovnání s jinými lignocelulosovými materiály, převážně hexosy jakožto dominantní sacharidy. Tento fakt je důležitý z hlediska možnosti využití tohoto odpadu jakožto substrátu pro fermentace.

### 5.1.2 Složení matolin

Pro experimenty byly používány matoliny odrůdy Svatovavřínecké získané z místního vinařství. Kromě stanovení množství fermentovatelných sacharidů a vlákniny, bylo stanoveno i množství celkových polyfenolických látek a anthokyanových barviv. Některé publikace se zabývají možným inhibičním efektem polyfenolických látek na růst bakterií mléčného kvašení [94][95][96][97].

Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2. Jednotlivé hodnoty jsou vztaženy na množství sušiny.

Tabulka 2: Složení matolin

	Množství (g na 100 g sušiny)
glukosa	$10,7 \pm 0,17$
fruktosa	$5,05 \pm 0,86$
galaktosa	$3,04 \pm 0,36$
arabiosa	$0,61 \pm 0,12$
polyfenoly	$7,47 \pm 0,02$
vláknina	$7,05 \pm 0,32$
anthokyany	$0,79 \pm 0,01$
množství sušiny	$41,39 \pm 0,12 \%$

V publikaci od *Kendalla a kol. 2015* uvádí podobné složení matolin stanovené metodou podle Sluitera [96]. Hodnoty se mírně liší, to může být způsobeno zkoumáním matolin z jiné odrůdy vinné révy. V této studii zkoumali odrůdu Cabernet Sauvignon, dalším faktorem způsobujícím rozdílnost výsledků může být i rozdílná lokalita, odkud byly matoliny získány. V této studii se uvádí ve složení matolin glukosa, xylosa a arabiosa. Vzhledem k tomu, že námi použitá kolona pro HPLC má velmi blízké retenční časy pro galaktosu a xylosu, je pravděpodobné, že se mohlo jednat o oba sacharidy. V další publikaci od *Pedrase a kol. 2017* uvádí ve složení hydrolyzátu glukosu, fruktosu, manosu, galaktosu a xylosu, nicméně pro stanovení a hydrolýzu byla použita jiná metody hydrolýzy a analýzy [98]. Celkové množství strukturních sacharidů v matolinách v těchto publikacích se pohybuje v rozmezí 16,0 až 23,2 g na 100 g sušiny, takže námi získaná hodnota 19,4 g na 100 g sušiny je pravděpodobná [97][98].

Z daných výsledků lze tedy předpokládat, že při vhodně zvoleném způsobu hydrolýzy je matolína využitelná jakožto fermentační substrát.

### 5.1.3 Složení pomerančových slupek

Pro experimenty byly použity slupky pomerančů z odrůdy Navel. Byla stanovena množství fermentovatelných sacharidů, vlákniny, celulosy a množství sušiny. Naměřené hodnoty jsou vztaženy na množství sušiny a shrnuty v Tabulce 3.

*Tabulka 3: Složení pomerančových slupek*

	Množství (g na 100 g sušiny)
glukosa	$19,48 \pm 0,81$
galaktosa	$3,97 \pm 0,25$
fruktosa	$7,54 \pm 2,14$
arabiosa	$4,50 \pm 0,95$
vláknina	$64,46 \pm 1,96$
celulosa	$12,64 \pm 0,60$
množství sušiny	$22,59 \pm 0,22 \%$

Bylo zjištěno, že kompletní hydrolýzou pomerančových slupek lze získat až 35,49 g na 100 g sušiny monosacharidů ve formě glukosy, fruktosy, arabiosy a galaktosy. Pomerančové slupky tedy obsahují poměrně vysoké množství sacharidů, což je předurčuje jako nadějný substrát pro fermentace. V publikacích věnovaných zpracování odpadů z pomerančů jsou uvedeny podobné koncentrace a složení sacharidů, jaké byly naměřeny [99][100][101].

Existují zde odchylky, které však mohou záviset od zralosti a místa původu pomerančů, z nichž byly získány zkoumané slupky. V uvedených publikacích byly využívány i jiné metody pro zjištění daných parametrů, což může také způsobovat rozdílnost naměřených hodnot.

## 5.2 Optimalizace hydrolýz vybraných substrátů

Nazelení vhodného způsobu hydrolýzy je důležité z hlediska zpřístupnění jednoduchých fermentovatelných sacharidů pro následnou fermentaci vybranými mikroorganismy. Existuje mnoho způsobů hydrolýzy lignocelulosových materiálů. Nevýhodou některých způsobů jsou však vyšší náklady na použité chemikálie či možnost vzniku inhibičních látek v hydrolázatech. Z toho důvodu byly provedeny optimalizace hydrolýz jednotlivých substrátů. Bylo provedeno několik způsobů hydrolýz kombinujících fyzikální, chemické a enzymatické způsoby. Postupy optimalizací hydrolýz jednotlivých substrátů jsou uvedeny v kapitole 4.6 [102].

### 5.2.1 Hydrolýzy kávové sedliny

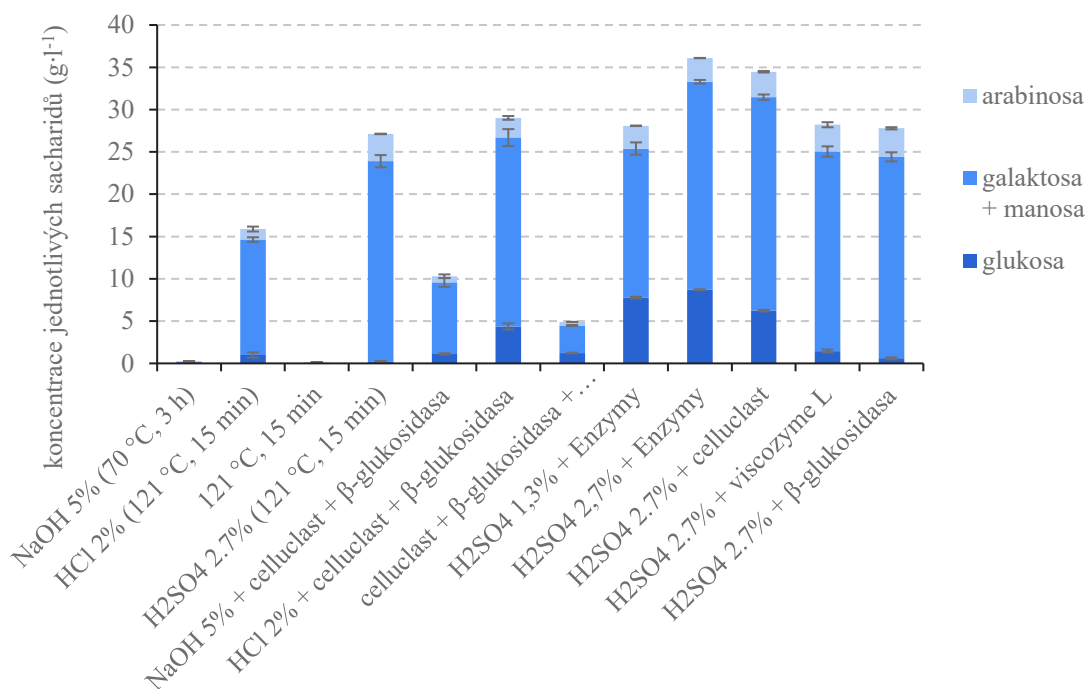
Jednotlivé způsoby optimalizace hydrolýz kávové sedliny byly provedeny podle postupů uvedených v kapitole 4.6.1. Byly porovnány koncentrace získaných monosacharidů během jednotlivých způsobů hydrolýz (Tabulka 4).

Tabulka 4: Celková množství fermentovatelných sacharidů hydrolýzami kávové sedliny

způsob hydrolýzy	c (g·l <sup>-1</sup> )
NaOH 5 % (70 °C, 3 h)	0,23 ± 0,03
HCl 2 % (121 °C, 15 min)	15,88 ± 0,29
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % (121 °C, 15 min)	27,12 ± 0,25
121 °C, 15 minut	0,12 ± 0,001
NaOH 5 % + Celluclast + β-glukosidasa	10,30 ± 0,27
HCl 2 % + Celluclast + β-glukosidasa	29,02 ± 0,53
Enzymy (Celluclast, β-glukosidasa, Viscozyme L)	4,90 ± 0,02
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,3 % + enzymy (Celluclast, β-glukosidasa, Viscozyme L)	28,09 ± 0,28
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % + enzymy (Celluclast, β-glukosidasa, Viscozyme L)	36,09 ± 0,09
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % + Celluclast	34,47 ± 0,17
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % + Viscozyme L	28,21 ± 0,36
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % + β-glukosidasa	27,79 ± 0,26

Na hydrolýzu kávové sedliny byly využity různé způsoby chemické, fyzikální a enzymatické hydrolýzy. Jakožto nejúčinnější způsob hydrolýzy kávové sedliny byla kombinace kyselé hydrolýzy pomocí 2,7% kyseliny sírové při 121 °C po dobu 15 minut s následnou enzymatickou hydrolýzou směsí enzymů (Celluclast, β-glukosidasa, Viscozyme L). Tento způsob hydrolýzy byl také následně zvolen pro předúpravu kávové sedliny před fermentací. Byla zjišťována i množství jednotlivých sacharidů získaných při různých způsobech hydrolýzy kávové sedliny (Graf 1).





*Graf 1: Koncentrace jednotlivých sacharidů při různých způsobech hydrolýzy kávové sedliny*

Z výsledků je patrné, že již po samotné kyselé hydrolýze 2,7% kyselinou sírovou v kombinaci s vysokou teplotou byla zhydrolyzována většina hemicelulosy, což umožňuje při enzymatické hydrolýze celulosy získání vyššího výtěžku glukosy. Z toho důvodu bylo získáno vyšší množství glukosy při použití vyšší koncentrace kyseliny sírové.

V porovnání s hodnotami uvedenými v Tabulce 1 (kapitola 5.1.1), kde jsou uvedeny hodnoty získány metodou založenou na kompletní hydrolýze daného materiálu nejúčinnější hydrolýzou bylo získáno 7,46 g na 100 g sušiny glukosy, 21,07 g na 100 g sušiny galaktosy + manosy a 2,4 g na 100 g sušiny arabinosy, což percentuelně odpovídá výtěžnosti hydrolýzy: 74,5 % glukosy, 53,2 % galaktosy + manosy a 70,8 % arabinosy.

### 5.2.2 Hydrolýzy matolin

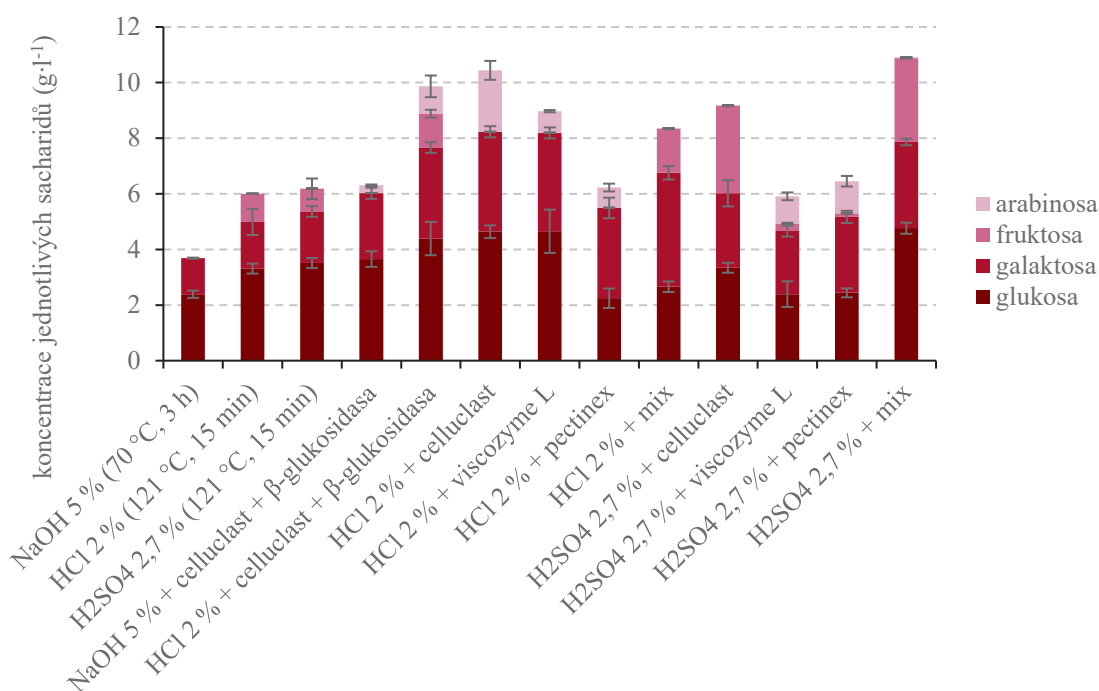
Byly provedeny optimalizace hydrolýz matolin různými způsoby, které jsou blíže popsány v kapitole 4.6.2. Jednotlivé hydrolýzy byly porovnány z hlediska konečných koncentrací fermentovatelných sacharidů (Tabulka 5).

*Tabulka 5: Celková množství získaných fermentovatelných sacharidů hydrolyzami matolin*

<b>způsob hydrolyzy</b>	<b>c (g·l<sup>-1</sup>)</b>
NaOH 5 % (70 °C, 3 h)	3,69 ± 0,04
HCl 2 % (121 °C, 15 min)	6,01 ± 0,17
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % (121 °C, 15 min)	6,19 ± 0,19
NaOH 5 % + Celluclast + β-glukosidasa	6,31 ± 0,13
HCl 2 % + Celluclast + β-glukosidasa	9,87 ± 0,33
HCl 2 % + Celluclast	10,44 ± 0,19
HCl 2 % + Viscozyme L	8,97 ± 0,25
HCl 2 % + Pectinex	6,23 ± 0,21
HCl 2 % + enzymy (Celluclast, Pectinex, Viscozyme L)	8,36 ± 0,11
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % + Celluclast	9,18 ± 0,17
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % + Viscozyme L	6,91 ± 0,20
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % + Pectinex	6,45 ± 0,14
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7 % + enzymy (Celluclast, Pectinex, Viscozyme L)	10,91 ± 0,11

Matoliny byly podrobeny různým způsobům fyzikální, chemické a enzymatické hydrolyzy. I v případě matolin byla nejúčinnějším způsobem hydrolyzy dvoustupňová hydrolyza 2,7% kyselinou sírovou při 121 °C po dobu 15 minut s následnou enzymatickou hydrolyzou směsí enzymů (Celluclast, β-glukosidasa, Viscozyme L). Tento způsob hydrolyzy byl následně zvolen pro předúpravu matolin před fermentací. Množství jednotlivých sacharidů získané při různých typech hydrolyzy matolin a jejich celkové porovnání je zobrazeno v Grafu 2.

Z výsledků lze usuzovat, že již po samotné kyselé hydrolyze 2,7% kyselinou sírovou v kombinaci s vysokou teplotou byla zhydrolyzována většina hemicelulos, což umožňuje při enzymatické hydrolyze celulosy získání vyššího výtěžku glukosy. Podobné množství monosacharidů bylo dosaženo i pomocí 2% kyseliny chlorovodíkové. Pro hydrolyzu matolin před fermentací však byla upřednostněna předúprava 2,7% kyselinou sírovou vzhledem k tomu, že během následné enzymatické hydrolyzy vzniklo vyšší množství fruktosy na úkor arabinosy, která je obtížněji utilizovatelná mikroorganismy.



Graf 2: Koncentrace jednotlivých sacharidů při různých způsobech hydrolýzy matoliny

Porovnáním hodnot uvedených v Tabulce 2 (kapitola 5.1.2) získaných metodou založenou na kompletní hydrolýze daného materiálu. Nejúčinnější hydrolýzou bylo získáno 3,17 g na 100 g sušiny glukosy, 2,07 g na 100 g sušiny galaktosy, 2,01 g na 100 g sušiny fruktosy a 0,02 g na 100 g sušiny arabinosy. To percentuelně odpovídá výtěžnosti hydrolýzy: 29,66 % glukosy, 67,98 % galaktosy, 39,74 % fruktosy a 3,28 % arabinosy.

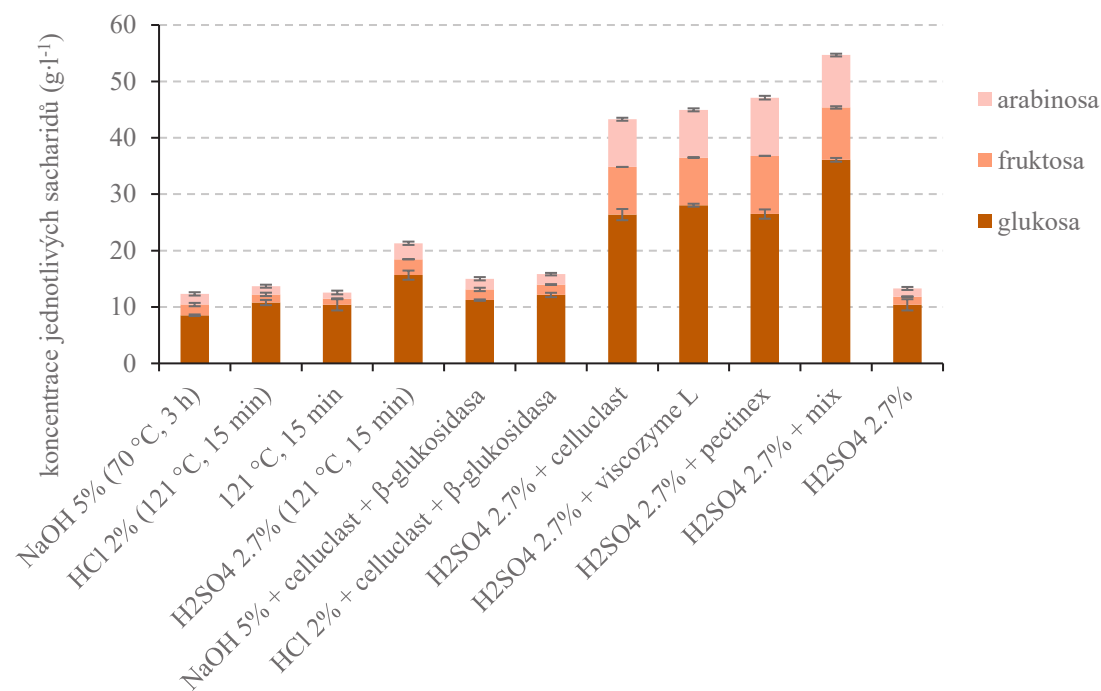
### 5.2.3 Pomerančové slupky

Tak jako u matolin a kávové sedliny, bylo i v případě pomerančových slupek provedeno několik způsobů chemických, fyzikálních a enzymatických hydrolýz. Postupy optimalizací hydrolýz pomerančových slupek jsou uvedeny v kapitole 4.6.3. Porovnání celkových koncentrací získaných monosacharidů z jednotlivých způsobů hydrolýz je uvedeno v Tabulce 6.

*Tabulka 6: Celková množství získaných fermentovatelných sacharidů hydrolýzami pomerančových slupek*

<b>způsob hydrolýzy</b>	<b>c (g·l<sup>-1</sup>)</b>
NaOH 5% (70 °C, 3 h)	16,21 ± 0,25
HCl 2% (121 °C, 15 min)	18,02 ± 0,34
121 °C, 15 min	16,26 ± 0,44
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7% (121 °C, 15 min)	25,65 ± 0,37
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7%	17,62 ± 0,42
NaOH 5% + Celluclast + β-glukosidasa	18,90 ± 0,24
HCl 2% + Celluclast + β-glukosidasa	20,76 ± 0,20
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7% + Celluclast	52,62 ± 0,42
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7% + Viscozyme L	54,75 ± 0,18
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7% + Pectinex	54,32 ± 0,38
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,7% + enzymy (Celluclast, β-glukosidasa, Viscozyme L, Pectinex)	60,61 ± 0,26

V případě pomerančových slupek byla opět nejúspěšnější hydrolýzou kombinace 2,7% kyseliny sírové při 121 °C po dobu 15 minut v kombinaci s následnou enzymatickou hydrolýzou. Zde byly použity také jako u předešlých substrátů enzymové preparáty Celluclast, β-glukosidasa a Viscozyme L, navíc však byl přidán enzym pektinasa (Pectinex). Tento způsob dvoustupňové hydrolýzy byl nejúčinnějším a byl dále používán pro předúpravu pomerančových slupek před fermentacemi. V grafu 3 je blíže znázorněno množství jednotlivých monosacharidů získaných při různých způsobech hydrolýz.



*Graf 3: Koncentrace jednotlivých sacharidů při různých způsobech hydrolýzy pomerančových slupek*

Z porovnání jednotlivých hydrolýz lze pozorovat, že při neenzymatických hydrolýzách bylo nejvyšších koncentrací monosacharidů dosaženo právě při použití 2,7% kyseliny sírové. Přídavek enzymů v případě prvního kroku hydrolýzy za použití hydroxidu sodného či kyseliny chlorovodíkové nedošlo k takovému nárůstu monosacharidů jako v případě použití kyseliny sírové. Lze tedy usuzovat, že kyselina sírová byla nejvhodnější pro hydrolýzu hemicelulos obsažených v pomerančových slupkách, což umožnilo účinnější enzymatickou hydrolýzu.

Opět porovnáním hodnot získaných metodou kompletní hydrolýzy daného materiálu, které jsou uvedeny v Tabulce 3 (kapitola 5.1.3) zjistíme, že nejúčinnější hydrolýzou bylo získáno 14,44 g na 100 g sušiny glukosy, 6,09 g na 100 g sušiny fruktosy a 3,72 g na 100 g sušiny arabinosy. Což percentuálně odpovídá výtěžnosti hydrolýzy: 74,11 % glukosy, 80,74 % fruktosy a 82,58 % arabinosy. Při stanovení složení pomerančových slupek byl zjištěn i obsah galaktosy, která se však při měření vzorků z optimalizací hydrolýz nezobrazovala. Mohlo dojít k neodseparování fruktosy a galaktosy, jelikož jejich retenční časy se v našem případě lišily pouze o 0,1 minuty. Vzhledem k poměrně vysoké koncentraci fruktosy je tedy možné, že se jedná o směs fruktosy a galaktosy spojených do jednoho píku, což však není nutné zcela řešit vzhledem k tomu, že oba sacharidy jsou poměrně dobře utilizovatelné vybranými mikroorganismy.

#### 5.2.4 Shrnutí

U vybraných odpadů z potravinářských výrob byly provedeny optimalizace hydrolýzy pomocí kombinace různých typů hydrolýz. Jednotlivé odpadní substráty byly před hydrolýzami rozemlety (kromě kávové sedliny), aby byly narušeny struktury přítomných polysacharidů. Následně byly zkoušeny různé kombinace fyzikálních (vysoká teplota), chemických (kyselá, bazická) a enzymatických typů hydrolýz.

Existuje mnoho způsobů hydrolýz lignocelulosoových materiálů. V této práci byly vybrány kyselé hydrolýzy zředěnými kyselinami (sírovou a chlorovodíkovou) za vysoké teploty (121 °C). Další možností kyselé hydrolýzy je použití silné kyseliny v kombinaci s nízkou teplotou, nicméně během tohoto způsobu hydrolýzy dochází k tvorbě inhibičních látek pro mikroorganismy (kyselina octová, furfural a 5-hydroxymethylfurfural). Dále pak byla zkoušena alkalická hydrolýza pomocí 5 hm. % hydroxidu sodného při 70 °C po dobu 3 hodin. Byla také vyzkoušena hydrolýza pouze autoklávováním suspenze substrátu s vodou, aby byl porovnán efekt přidavku kyseliny a hydroxidu na hydrolýzu [102][103][104][105].

Po chemických hydrolýzách byly provedeny enzymatické hydrolýzy, kde byly použity různé druhy enzymů, a to celulasa (Celluclast 1.5L), hemicelulasa ( $\beta$ -glukosidasa), pektinasa (Pectinex) a enzymatický preparát se směsí celulolytických enzymů (Viscozyme L). Enzymový preparát Viscozyme L je tvořen enzymy: arabinasou, celulasou,  $\beta$ -glukanasou, hemicelulasou a xylanasou. Jednotlivé enzymy byly v různých kombinacích aplikovány na vybrané substráty, které byly předupraveny hydrolýzou 2,7% kyselinou sírovou při 121 °C. Bylo vyzkoušeno i působení enzymů na substráty předupravené kyselinou chlorovodíkovou a hydroxidem sodným. [106]

Bylo zjištěno, že u vybraných substrátů byl nejúčinnějším způsobem hydrolýzy kombinace zředěné kyseliny sírové (2,7 hm.%) za vysoké teploty v kombinaci s následnou enzymatickou hydrolýzou. Tato dvoustupňová hydrolýza byla nejúčinnější i vzhledem k tomu, že působení kyseliny za vysoké teploty způsobí rozrušení lignocelulosoové struktury a zpřístupnění celulosy a hemicelulosy pro enzymy. Ačkoliv hydroxid sodný působí také na rozrušení struktury ligninu a celulosy, dochází ke vzniku menšího množství fermentovatelných sacharidů, k čemuž došlo i v našem případě. V literatuře se uvádí, že v některých případech již není nutno po kyselé hydrolýze přidávat enzymy, nicméně v případě odpadů vybraných pro tuto práci došlo ještě k navýšení fermentovatelných sacharidů [107][108][109].

#### 5.3 Produkce kyseliny mléčné

Pro produkci kyseliny mléčné na odpadních substrátech je nutné především nalézt vhodného producenta, který je schopen utilizace jednotlivých sacharidů obsažených v hydrolyzátu odpadního substrátu. Byla tedy sledována schopnost růstu a produkce kyseliny

mléčné vybranými producenty nejprve na syntetických médiích s obsahem jednotlivých sacharidů a následně na jednotlivých hydrolyzátech odpadních substrátů.

### 5.3.1 Screening růstu na vybraných sacharidech

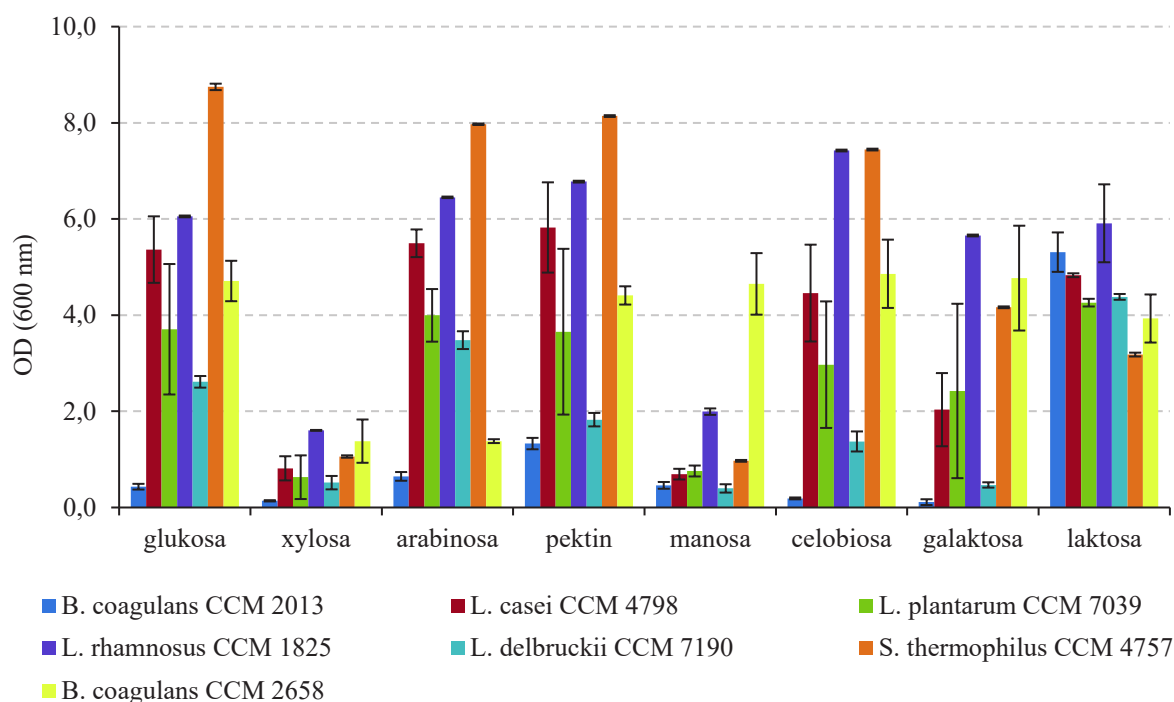
Bylo vybráno 7 producentů kyseliny mléčné pro testování schopnosti růstu a produkce kyseliny mléčné na různých sacharidech. Konkrétně byli vybráni: *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bacillus coagulans* CCM 2013, *Bacillus coagulans* CCM 2658, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757. Všechny tyto kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

Tyto kmeny byly vybrány jako reprezentativní kmeny běžně používané pro bioprodukci kyseliny mléčné. Producenti byli vybráni i tak, aby byly vyprodukovány různé formy kyseliny mléčné, a to samostatné optické izomery i racemická směs. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* a *Streptococcus thermophilus* mají schopnost produkce L (+) izomeru. *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* produkuje D (-) izomer a *Lactobacillus plantarum* tvoří racemickou směs kyseliny mléčné. *B. coagulans* byl vybrán z důvodu schopnosti růstu a produkce za vysokých teplot. Další výhodou jsou nízké požadavky na živiny a možnost produkce opticky čisté L (+) kyseliny mléčné [14][54][110][111][112].

Jako médium bylo připraveno MRS médium, kde glukosa byla nahrazena jinými sacharidy, které se mohou vyskytovat v odpadech z potravinářských výrobníků. Konkrétně se jednalo o: glukosu, xylosu, manosu, arabinosu, celobiosu, galaktosu, pektin a laktosu. Postup přípravy jednotlivých médií a experimentu je blíže popsán v kapitole 4.9.1.

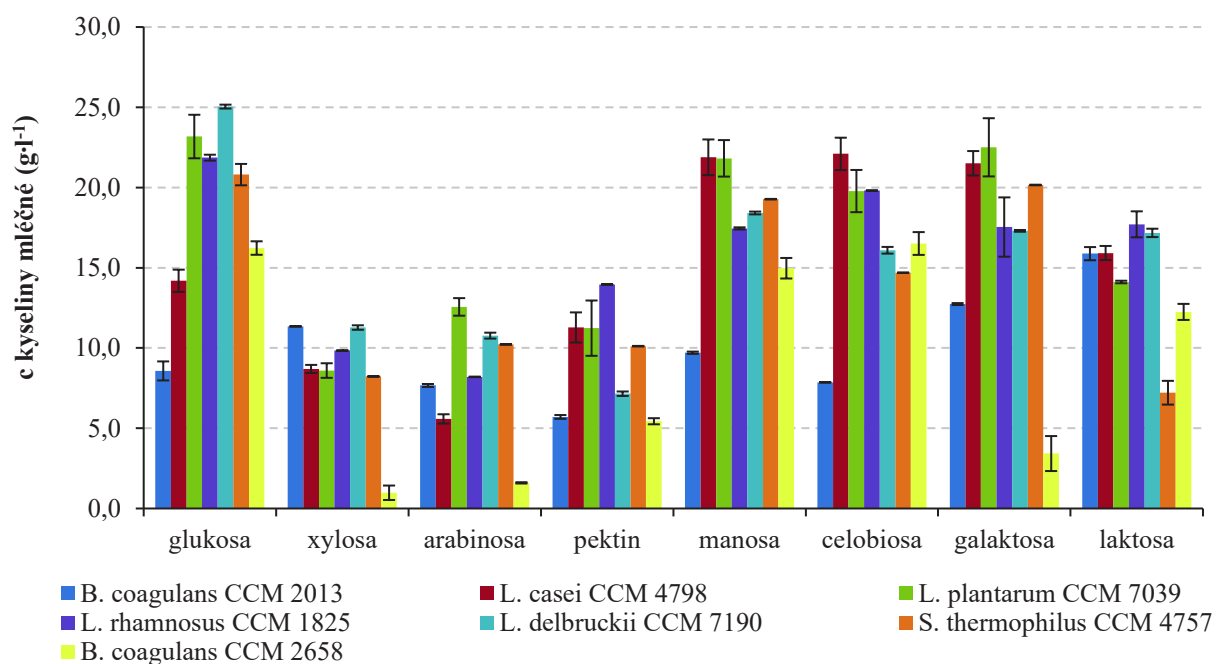
Byly porovnány hodnoty optických hustot naměřeny po 48 hodinách kultivace jednotlivých kmenů na vybraných sacharidech, aby byla vyhodnocena schopnost růstu na těchto sacharidech (Graf 4). Dále byly porovnány dosažené koncentrace kyseliny mléčné po 48 hodinách kultivace, aby byla zjištěna schopnost utilizace jednotlivých sacharidů vybranými kmeny (Graf 5).





Graf 4: Růst mikroorganismů na jednotlivých sacharidech

Růst jednotlivých kmenů byl sledován metodou měření optické hustoty. Z výsledků je patrné, že mikroorganismy na jednotlivých sacharidech byly schopny růstu. U některých kmenů byly naměřeny nižší hodnoty optické hustoty, což však může být ovlivněno i velikostí buněk jednotlivých kmenů [113].



Graf 5: Produkce kyseliny mléčné na jednotlivých sacharidech

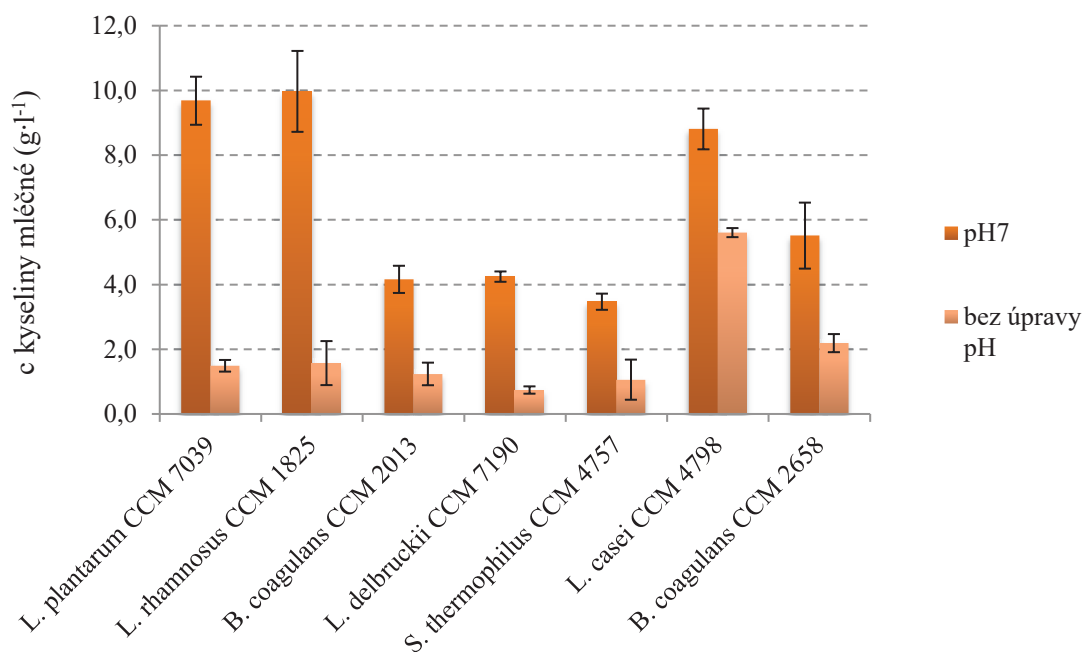
Bylo ověřeno, že vybrané bakteriální kmeny jsou schopny využít v syntetickém médiu jednotlivé sacharidy, které se mohou vyskytovat i v odpadech z potravinářských výrob. Porovnáním lze pozorovat, že utilizace některých sacharidů (konkrétně xylosy a arabinosy) je pro vybrané kmeny obtížnější [14][41][125].

### 5.3.2 Screening růstu na jednotlivých hydrolyzátech

Po provedení kultivací vybranými mikroorganismy na syntetickém médiu byla testována schopnost produkce kyseliny mléčné i přímo na hydrolyzátech vybraných odpadních materiálů. Za tímto účelem byly připraveny hydrolyzáty jednotlivých odpadů podle postupů uvedených v kapitole 4.7. Následně na jednotlivých hydrolyzátech byly provedeny kultivace vybranými mikroorganismy (kapitola 4.1.2), aby byl nalezen nejvhodnější producent kyseliny mléčné pro konkrétní odpad. Jednotlivé kultivace byly prováděny podle postupu uvedeného v kapitole 4.9.2.

#### 5.3.2.1 Fermentace na hydrolyzátu pomerančových slupek

Byly provedeny kultivace vybranými producenty na hydrolyzátu pomerančových slupek připraveném podle postupu uvedeném v kapitole 4.7.2. Byly zvoleny dvě podmínky kultivace, a to s upraveným pH na hodnotu 7 a bez úpravy pH hydrolyzátu. Na úpravu pH byl použit 5 mol·l<sup>-1</sup> hydroxid sodný. Hodnota pH v hydrolyzátu bez úpravy činila 4,05. Konečné výsledky kultivací na hydrolyzátu pomerančových slupek jsou shrnuty v Grafu 6.



Graf 6: Produkce kyseliny mléčné vybranými producenty na hydrolyzátu pomerančových slupek

Z výsledků je patrné, že produkce kyseliny mléčné byla vyšší u hydrolyzátu s upraveným pH 7. Nejvyššího výtěžku kyseliny mléčné bylo dosaženo použitím kmene *Lbc. rhamnosus* CCM 1825. Tento kmen je výhodným producentem i z hlediska schopnosti produkce výhradně L(+) izomeru kyseliny mléčné. Vzhledem k této skutečnosti je *Lbc. rhamnosus* vhodnějším producentem oproti kmeni *Lbc. plantarum*, který produkuje racemickou směs kyseliny mléčné. Výběr producenta se ovšem odvíjí i od požadavku na výsledný produkt a požadovanou optickou čistotu [54][112][114].

V Tabulce 7 jsou uvedena množství kyseliny mléčné vzniklá v hydrolyzátu s upraveným pH. Jsou zde uvedeny i hodnoty produktivit a výtěžnostní koeficienty vzniklé kyseliny mléčné při použití jednotlivých kmenů.

Tabulka 7: Produktivita a koncentrace kyseliny mléčné jednotlivými producenty na hydrolyzátu pomerančových slupek při pH 7

Mikroorganismus	množství kyseliny mléčné (g·l <sup>-1</sup> )	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g·g <sup>-1</sup> )	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>L. plantarum</i> CCM 7039	9,68 ± 0,74	18,50	0,52	0,20
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825	9,97 ± 1,25	18,67	0,53	0,21
<i>B. coagulans</i> CCM 2013	4,16 ± 0,42	9,42	0,44	0,09
<i>L. delbrückii</i> CCM 7190	4,25 ± 0,16	9,57	0,44	0,09
<i>S. thermophilus</i> CCM 4757	3,47 ± 0,25	7,83	0,44	0,07
<i>L. casei</i> CCM 4798	8,81 ± 0,63	17,20	0,51	0,18
<i>B. coagulans</i> CCM 2658	5,51 ± 1,02	11,04	0,50	0,11

Z uvedených dat je patrné, že nejvyšší produktivity a výtěžnostního koeficientu bylo dosaženo v případě kmene *L. rhamnosus* CCM 1825. Nicméně kmen *L. plantarum* CCM 7039 neměl hodnoty těchto parametrů výrazně nižší. V případě dalších optimalizací a produkci kyseliny mléčné na hydrolyzátu pomerančových slupek by šlo uvažovat o obou těchto kmenech jako o možných producentech v závislosti na požadavku na výsledný produkt.

V Tabulce 8 jsou uvedena množství kyseliny mléčné vzniklá kultivací na hydrolyzátu bez upraveného pH. Jsou zde uvedeny i hodnoty jednotlivých produktivit a výtěžnostních koeficientů.

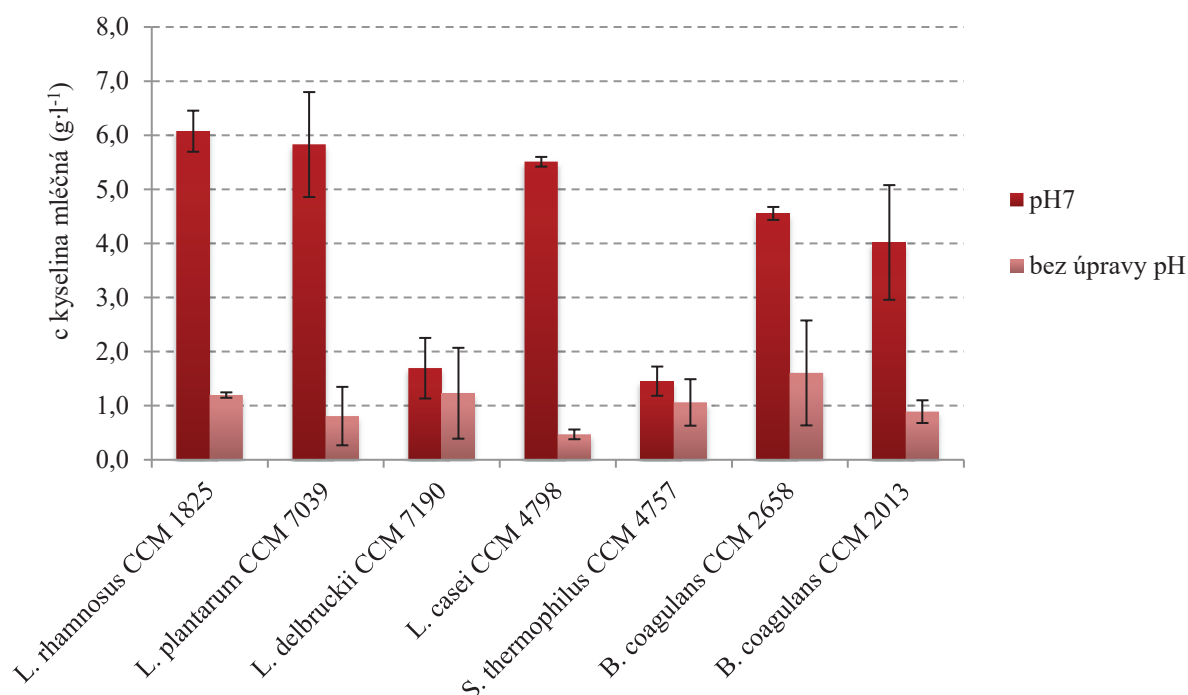
Tabulka 8: Produktivita a koncentrace kyseliny mléčné jednotlivými producenty na hydrolyzátu pomerančových slupek bez úpravy pH

Mikroorganismus	množství kyseliny mléčné (g·l <sup>-1</sup> )	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>L. plantarum</i> CCM 7039	1,49 ± 0,18	3,64	0,41	0,03
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825	1,57 ± 0,68	3,72	0,42	0,03
<i>B. coagulans</i> CCM 2013	1,24 ± 0,35	2,98	0,42	0,03
<i>L. delbruckii</i> CCM 7190	0,74 ± 0,11	1,67	0,44	0,02
<i>S. thermophilus</i> CCM 4757	1,06 ± 0,62	2,92	0,36	0,02
<i>L. casei</i> CCM 4798	3,61 ± 0,14	7,89	0,46	0,08
<i>B. coagulans</i> CCM 2658	2,19 ± 0,28	5,06	0,44	0,05

V případě hydrolyzátu bez úpravy pH byly produktivity a výtěžnostní koeficienty výrazně nižší oproti hydrolyzátu s pH 7. V tomto případě bylo nejvyšší produktivity a výtěžku kyseliny mléčné dosaženo kmenem *L. casei* CCM 4798.

#### 5.3.2.2 Fermentace hydrolyzátu matolin

Byly provedeny kultivace vybranými producenty na hydrolyzátu matolin připraveném podle postupu uvedeném v kapitole 4.7.3. Kultivace probíhala za dvou podmínek, a to v hydrolyzátu bez upraveného pH a v hydrolyzátu s pH 7. Na úpravu pH byl použit 5 mol·l<sup>-1</sup> hydroxid sodný. Hodnota pH v hydrolyzátu bez úpravy činila 3,75. Výtěžky kyseliny mléčné z jednotlivých kultivací byly graficky porovnány (Graf 7).



Graf 7: Produkce kyseliny mléčné vybranými producenty na hydrolyzátu matolin

Tak jako u hydrolyzátu pomerančových slupek, i v případě hydrolyzátu matolin bylo dosaženo vyšších koncentrací kyseliny mléčné v médiu s pH upraveným na hodnotu 7. V případě matolin byl taktéž nejúspěšnějším producentem *L. rhamnosus* CCM 1825. Poměrně vysokých koncentrací kyseliny mléčné bylo dosaženo i kmeny *L. plantarum* CCM 7039 a *L. casei* CCM 4798.

V Tabulce 9 jsou shrnuta jednotlivá množství kyseliny mléčné produkovaná na hydrolyzátu s upraveným pH. Byly také vypočteny hodnoty produktivity a výtěžnostní koeficienty vzniklé kyseliny mléčné při použití jednotlivých kmenů.

Tabulka 9: Produktivita a koncentrace kyseliny mléčné jednotlivými producenty na hydrolyzátu matolin při pH 7

Mikroorganismus	množství kyseliny mléčné (g·l <sup>-1</sup> )	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825	6,07 ± 0,38	6,73	0,90	0,13
<i>L. plantarum</i> CCM 7039	5,83 ± 0,97	6,58	0,89	0,12
<i>L. delbrückii</i> CCM 7190	1,69 ± 0,56	3,32	0,51	0,04
<i>L. casei</i> CCM 4798	5,51 ± 0,09	6,19	0,89	0,11
<i>S. thermophilus</i> CCM 4757	1,45 ± 0,27	3,99	0,36	0,03
<i>B. coagulans</i> CCM 2658	4,55 ± 0,12	6,19	0,74	0,09
<i>B. coagulans</i> CCM 2013	4,02 ± 1,06	6,69	0,60	0,08

Nejvyšší produktivity a výtěžnostního koeficientu bylo dosaženo kmenem *L. rhamnosus* CCM 1825. Poměrně vysoké výtěžnosti bylo dosaženo i kmeny *L. casei* CCM 2798 a *L. plantarum* CCM 7039.

V Tabulce 10 jsou shrnuty koncentrace, hodnoty výtěžnostních koeficientů a produktivit kyseliny mléčné dosažené jednotlivými kmeny na hydrolyzátu matolin bez upraveného pH.

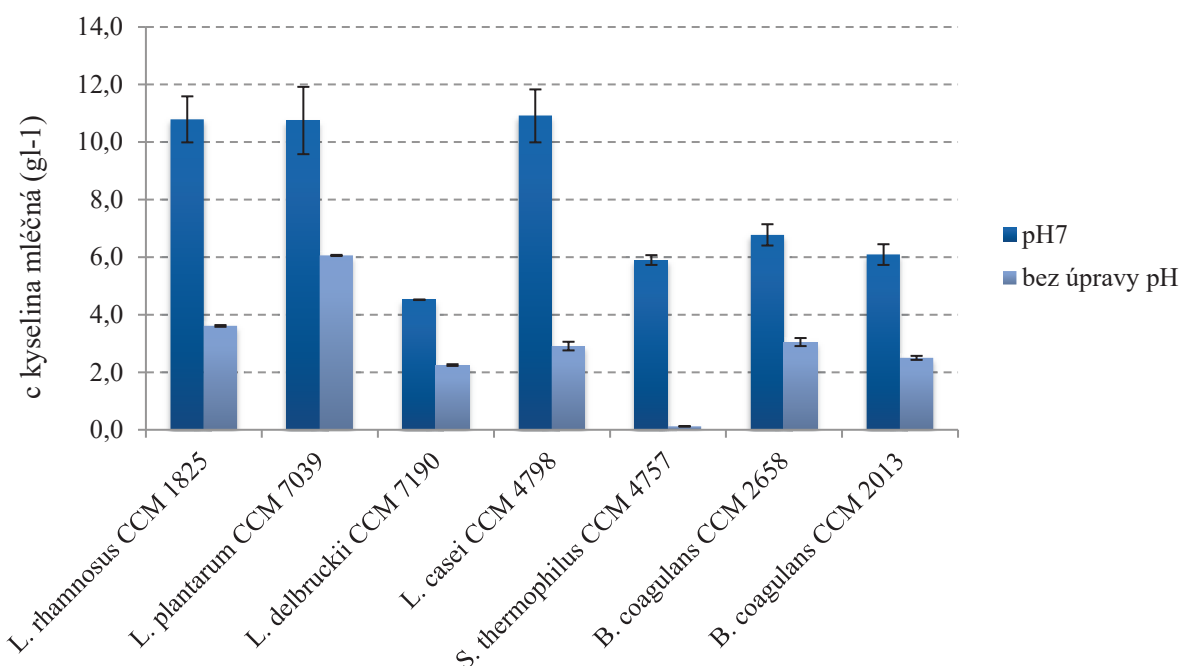
Tabulka 10: Produktivita a koncentrace kyseliny mléčné jednotlivými producenty na hydrolyzátu matolin bez úpravy pH

Mikroorganismus	množství kyseliny mléčné (g·l <sup>-1</sup> )	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825	1,20 ± 0,05	2,76	0,43	0,02
<i>L. plantarum</i> CCM 7039	0,81 ± 0,54	2,75	0,29	0,02
<i>L. delbruckii</i> CCM 7190	1,23 ± 0,84	3,08	0,40	0,03
<i>L. casei</i> CCM 4798	0,47 ± 0,09	4,07	0,12	0,01
<i>S. thermophilus</i> CCM 4757	1,06 ± 0,43	3,99	0,27	0,02
<i>B. coagulans</i> CCM 2658	1,61 ± 0,97	2,87	0,56	0,03
<i>B. coagulans</i> CCM 2013	0,89 ± 0,21	3,69	0,24	0,02

V případě kultivací na hydrolyzátu matolin bez upraveného pH bylo dosaženo nejvyšších koncentrací kyseliny mléčné kmenem *B. coagulans* CCM 2658.

### 5.3.2.3 Fermentace na hydrolyzátu kávové sedliny

Byly provedeny kultivace vybranými producenty na hydrolyzátu kávové sedliny připraveném podle postupu uvedeném v kapitole 4.7.1. Kultivace probíhala za dvou podmínek, a to v hydrolyzátu bez upraveného pH a v hydrolyzátu s pH 7. Na úpravu pH byl použit 5 mol·l<sup>-1</sup> hydroxid sodný. Hodnota pH v hydrolyzátu bez úpravy činila 4,30. Porovnání výsledných koncentrací kyseliny mléčné dosažených kultivacemi vybraných producentů na hydrolyzátu kávové sedliny jsou shrnuty v Grafu 8.



Graf 8: Porovnání výtěžků kyseliny mléčné vybranými producenty na hydrolyzátu kávové sedliny

Jako u předešlých substrátů, bylo i u kávové sedliny dosaženo vyšších koncentrací produktu v hydrolyzátu s pH 7. Nejvyššího výtěžku kyseliny mléčné bylo dosaženo kmenem *L. rhamnosus* CCM 1825. Nicméně rozdíl koncentrací kyseliny mléčné s kmenem *L. plantarum* CCM 7039 je nepatrný. Byly porovnány koncentrace, výtěžnostní koeficienty a produktivita kyseliny mléčné v hydrolyzátu s pH 7 (Tabulka 11), kde je patrné, že v případě kmene *L. rhamnosus* CCM 1825 bylo dosaženo vyššího výtěžnostního koeficientu, nicméně produktivita obou kmenů byla prakticky stejná.

Tabulka 11: Produktivita a koncentrace kyseliny mléčné jednotlivými producenty na hydrolyzátu kávové sedliny při pH 7

Mikroorganismus	množství kyseliny mléčné (g·l <sup>-1</sup> )	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>L. plantarum</i> CCM 7039	10,75 ± 1,17	12,30	0,87	0,22
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825	10,79 ± 0,80	12,05	0,90	0,22
<i>L. delbrückii</i> CCM 7190	4,52 ± 0,01	5,42	0,83	0,09
<i>L. casei</i> CCM 4798	10,71 ± 0,92	16,02	0,67	0,22
<i>S. thermophilus</i> CCM 4757	5,90 ± 0,17	10,02	0,59	0,12
<i>B. coagulans</i> CCM 2658	6,77 ± 0,37	11,09	0,61	0,14
<i>B. coagulans</i> CCM 2013	6,09 ± 0,36	9,15	0,67	0,13



Hodnoty produktivit, výtěžnostních koeficientů a koncentrace kyseliny mléčné získané kultivacemi na hydrolyzátu kávové sedliny bez úpravy pH jsou shrnuty v Tabulce 12.

Tabulka 12: Produktivita a koncentrace kyseliny mléčné jednotlivými producenty na hydrolyzátu kávové sedliny bez úpravy pH

Mikroorganismus	množství kyseliny mléčné (g·l <sup>-1</sup> )	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825	3,61 ± 0,03	13,45	0,27	0,08
<i>L. plantarum</i> CCM 7039	6,06 ± 0,02	12,22	0,50	0,13
<i>L. delbruckii</i> CCM 7190	2,25 ± 0,03	7,69	0,29	0,05
<i>L. casei</i> CCM 4798	2,91 ± 0,15	9,83	0,30	0,06
<i>S. thermophilus</i> CCM 4757	0,12 ± 0,01	2,13	0,06	0,00
<i>B. coagulans</i> CCM 2658	3,05 ± 0,14	7,20	0,42	0,06
<i>B. coagulans</i> CCM 2013	2,5 ± 0,07	6,30	0,40	0,05

Na hydrolyzátu kávové sedliny bez upraveného pH bylo nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné dosaženo kmenem *L. plantarum* CCM 7039.

Obruča a kol. (2014) ve své publikaci uvádí, že vhodným ředěním hydrolyzátu kávové sedliny lze podstatně zvýšit výtěžky polyhydrolykanoátů produkované pomocí *Burkholderia cepacia* z důvodu snížení koncentrace inhibičních látek [23]. Proto byly provedeny experimenty, kdy byl kmen *L. rhamnosus* kultivován na médiu s různým obsahem hydrolyzátu kávové sedliny po dobu 48 hodin (Tabulka 13). Nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné (11,18 ± 0,04 g·l<sup>-1</sup>) však bylo dosaženo na médiu obsahujícím 100 % hydrolyzátu kávové sedliny. Zdá se, že *L. rhamonosus* je méně citlivý na mikrobiální inhibitory než *B. cepacia* a zředěný hydrolyzát kávové sedliny pravděpodobně neposkytuje dostatečné množství uhlíkových substrátů. [23]

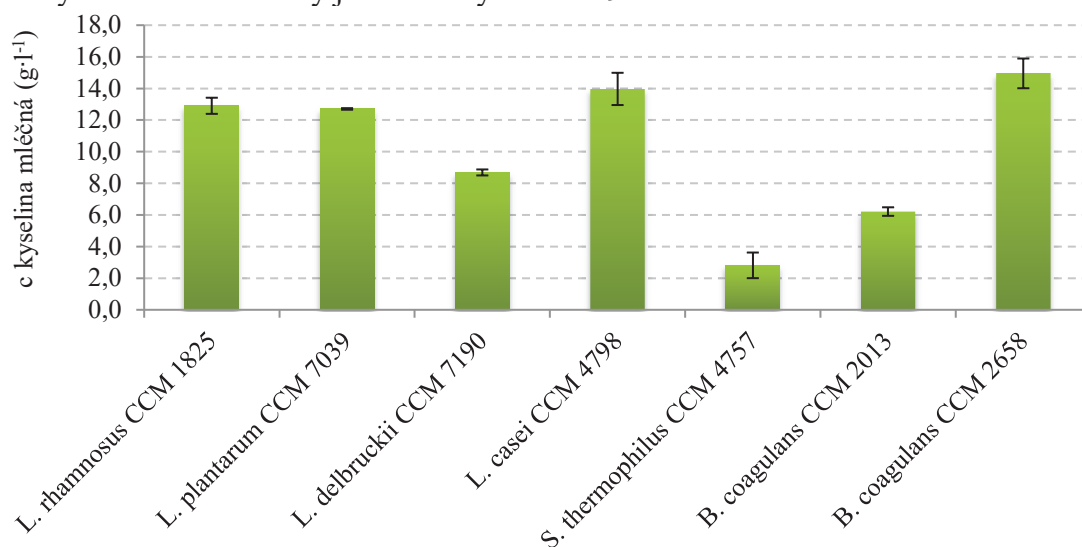
Tabulka 13: Kultivace *L. rhamnosus* na hydrolyzátu kávové sedliny o různé koncentraci

množství hydrolyzátu kávové sedliny (obj. %)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	spotřebované sacharidy (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
25	3.00 ± 0.05	4.02	0.75	0,06
50	3.98 ± 0.27	5.24	0.76	0,08
75	6.59 ± 0.12	8.21	0.80	0,14
100	11.18 ± 0.04	12.27	0.91	0,23

#### 5.3.2.4 Fermentace hydrolyzátu odpadního chleba

Byly provedeny kultivace vybranými producenty na hydrolyzátu kávové sedliny připraveném podle postupu uvedeném v kapitole 4.7.4. Kultivace probíhala pouze

na hydrolyzátu bez úpravy pH, jelikož hodnota pH hydrolyzátu byla 6,5. Porovnání výsledných koncentrací kyseliny mléčné dosažených kultivacemi vybraných producentů na hydrolyzátu kávové sedliny jsou shrnuty v Grafu 9.



Graf 9: Porovnání produkce kyseliny mléčné vybranými producenty na hydrolyzátu odpadního chleba

V případě hydrolyzátu odpadního chleba bylo nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné dosaženo kmenem *B. coagulans* CCM 2658. V Tabulce 14 jsou uvedeny vypočtené výtěžnostní koeficienty a produktivity. Z uvedených dat je patrné, že ačkoliv kmen *B. coagulans* CCM 2658 dosahl nejvyšší produktivity, kmeny *L. rhamnosus* CCM 1825 a *L. casei* CCM 4798 měly vyšší hodnoty výtěžnostních koeficientů. Výsledné koncentrace kyseliny mléčné u těchto producentů však nejsou výrazně rozdílné, lze tedy uvažovat o těchto třech producentech pro další výzkum produkce kyseliny mléčné na hydrolyzátu odpadního chleba.

Tabulka 14: Produktivita a koncentrace kyseliny mléčné jednotlivými producenty na hydrolyzátu odpadního chleba

Mikroorganismus	množství kyseliny mléčné (g·l <sup>-1</sup> )	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825	12,90 ± 0,51	15,04	0,86	0,27
<i>L. plantarum</i> CCM 7039	12,70 ± 0,05	16,60	0,77	0,26
<i>L. delbruckii</i> CCM 7190	8,69 ± 0,19	12,45	0,70	0,18
<i>B. coagulans</i> CCM 2658	14,95 ± 0,94	18,22	0,82	0,31
<i>L. casei</i> CCM 4798	13,97 ± 1,02	16,90	0,83	0,29
<i>S. thermophilus</i> CCM 4757	2,81 ± 0,81	3,99	0,70	0,06
<i>B. coagulans</i> CCM 2013	6,21 ± 0,27	9,33	0,67	0,13

#### 5.3.2.5 Porovnání hydrolyzátů odpadních substrátů z hlediska produkci

Z výsledků jednotlivých fermentací je patrné, že vybrané odpadní substráty jsou po hydrolyze využitelné pro produkci kyseliny mléčné. Experimenty bylo potvrzeno, že v jednotlivých hydrolyzátech před fermentací byla nutná úprava pH. Pozitivním faktem je, že jednotlivé hydrolyzáty sloužily jako substrát pro produkci kyseliny mléčné, ačkoliv nebyly přidány žádné další živiny. Tento fakt je velmi podstatný vzhledem k tomu, že bakterie mléčného kvašení jsou známy poměrně vysokými nároky na aminokyseliny, vitamíny a další komplexní živiny vyskytující se ve fermentačním médiu [48][115].

V Tabulce 15 byly porovnány jednotlivé odpadní substráty z hlediska množství vzniklé kyseliny mléčné, výtěžnostních koeficientů a produktivit. Vzhledem k tomu, že u většiny odpadních substrátů bylo nejvyšších koncentrací kyseliny mléčné dosaženo s použitím kmene *L. rhamnosus* CCM 1825, byly pro výsledné srovnání vybrány výsledky z kultivací právě tohoto kmene.

Tabulka 15: Porovnání výtěžností a produktivit kyseliny mléčné na jednotlivých odpadních substrátech

substrát	množství kyseliny mléčné (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
kávová sedlina	10,79 ± 0,80	0,90	0,22
matolina	6,07 ± 0,38	0,90	0,13
odpadní pečivo	12,90 ± 0,51	0,86	0,27
pomerančové slupky	9,97 ± 1,25	0,53	0,21

Nejvyšší koncentrace a produktivity kyseliny mléčné bylo dosaženo na hydrolyzátu odpadního pečiva. Hlavním důvodem bude pravděpodobně to, že odpadní chléb obsahuje

především glukosu. Ostatní vybrané substráty obsahují vedle glukosy i další sacharidy (galaktosu, manosu, arabinosu či fruktosu). Hlavní výhodou hydrolyzátu odpadního chleba je i obsah minerálních látek a živin, které mohou mít pozitivní vliv na růst a produkci vybraných mikroorganismů [35][117].

Ačkoliv byla produktivita největší na hydrolyzátu odpadního chleba, výtěžnostní koeficienty byly nejvyšší v případě hydrolyzátu kávové sedliny a matolin. Ačkoliv tyto substráty obsahují látky, které mohou inhibovat růst bakterií mléčného kvašení, zdají se být také nadějnými odpadními zdroji pro produkci kyseliny mléčné [94][95][97].

### 5.3.3 Produkce kyseliny mléčné v bioreaktoru

Z důvodu optimalizace a zvýšení množství vyprodukované kyseliny mléčné byly provedeny také kultivace v bioreaktoru. Pro produkci kyseliny mléčné v bioreaktoru byl zvolen jako producent kmen *L. rhamnosus* CCM 1825. Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole, tento kmen se jevil jako nejvhodnější producent z hlediska množství produktu vzniklého na jednotlivých hydrolyzátech odpadních substrátů, ale také z hlediska schopnosti produkovat čistou L(+) formu kyseliny mléčné.

Byly provedeny kultivace na hydrolyzátech pomerančových slupek, matolin, odpadního chleba a kávové sedliny. K jednotlivým hydrolyzátům (kromě odpadního chleba) byl přidán kvasničný extrakt o koncentraci  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . V případě hydrozátu odpadního chleba nebyl přídavek nutný vzhledem k jeho složení. Během kultivací bylo udržováno pH na hodnotě 6,5 postupným přidávkem  $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  NaOH. Postup kultivací v bioreaktoru je popsán v kapitole 4.9.3.

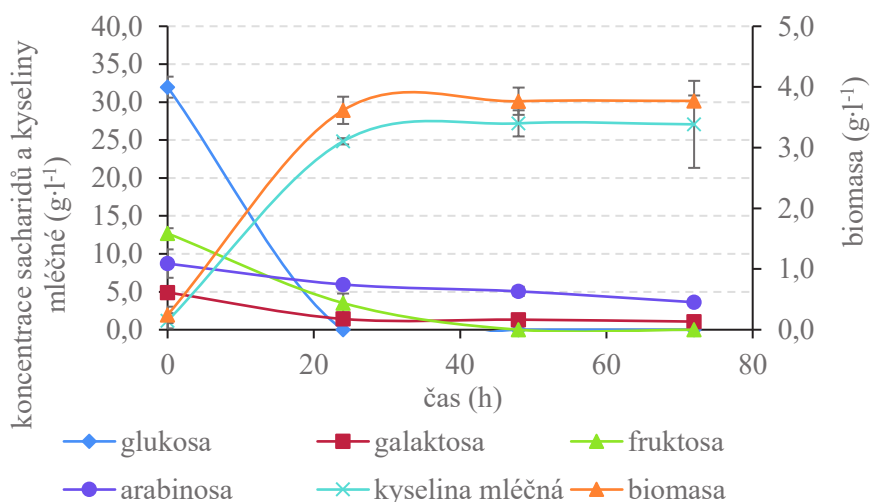
Součástí této kapitoly jsou i data naměřena v rámci zahraniční stáže v Rakousku, kde byla zkoumána produkce kyseliny mléčné v bioreaktorech na hydrolyzátu kávové sedliny. V návaznosti na to byly provedeny kultivace v bioreaktoru i pomocí dalších producentů (*B. coagulans* CCM 2658, *L. plantarum* CCM 7039).

#### 5.3.3.1 Fermentace na hydrolyzátu pomerančových slupek

Byla provedena kultivace *L. rhamnosus* CCM 1825 na hydrolyzátu pomerančových slupek v bioreaktoru. Pro fermentace v bioreaktoru byl použit přefiltrovaný hydrolyzát s přídávkem kvasničného extraktu o koncentraci  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Bioreaktor byl naplněn médiem až po sterilizaci z důvodu eliminace vzniku inhibičních látek vzniklých zahříváním hydrolyzátu a úbytku sacharidů. Postup kultivace je blíže popsán v kapitole 4.9.3.2. Časový průběh pH a přidávku neutralizačního činidla v bioreaktoru během kultivace je uveden v Příloze I graf 1.

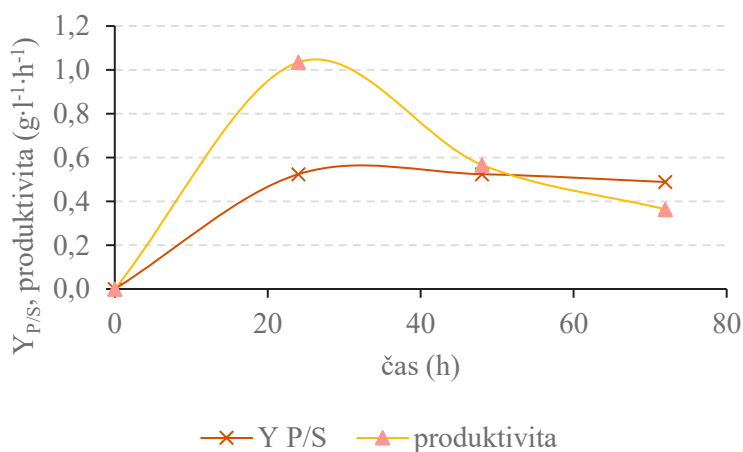
V grafu 10 je znázorněn časový průběh nárůstu biomasy, koncentrace kyseliny mléčné a spotřeby jednotlivých sacharidů stanovených v jednotlivých odběrech. Je patrné, že mezi 24. až 48. hodinou již docházelo k zpomalení růstu a produkce kyseliny mléčné. Od 48. hodiny

již byla koncentrace biomasy a kyseliny mléčné ustálena. Lze tedy usuzovat, že produkce kyseliny mléčné v bioreaktoru probíhala po dobu 48 hodin.



Graf 10: Časový průběh množství spotřebovaných sacharidů, vyprodukované kyseliny mléčné a biomasy v bioreaktoru na hydrolyzátu pomerančových slupek

Pomocí *L. rhamnosus* kultivovaného v bioreaktoru na hydrolyzátu pomerančových slupek bylo dosaženo  $27,39 \pm 0,19 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  kyseliny mléčné a výtěžnostní koeficient ( $Y_{P/S}$ ) byl  $0,52 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Produktivita procesu v 48. hodině byla  $0,57 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Porovnáním s produkcí v Erlenmeyerových baňkách byla koncentrace kyseliny vyšší o  $17,42 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a produktivita se zvýšila z  $0,21 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  na  $0,57 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Pro sledování časového průběhu produktivity a výtěžnostního koeficientu byl sestaven Graf 11.



Graf 11: Časový průběh produktivity a výtěžnostního koeficientu fermentace hydrolyzátu pomerančových slupek v bioreaktoru

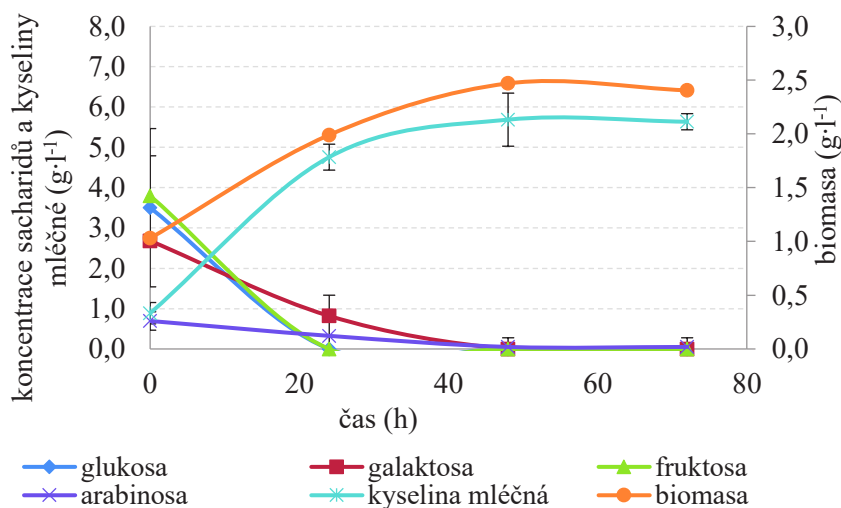
Z tohoto grafu lze vyčíst, že výtěžnostní koeficient tvorby produktu ze substrátu byl již od 24. hodiny prakticky konstantní a produktivita dokonce od tohoto času začala klesat. Nejvyšší

produktivity tedy bylo dosaženo v 24. hodině, a to  $1,03 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Lze tedy skutečně usuzovat, že v rozmezí 24. až 48. hodiny již docházelo k poklesu, a tedy i ukončení produkce kyseliny mléčné v bioreaktoru.

### 5.3.3.2 Fermentace na hydrolyzátu matolin

Byla provedena kultivace *L. rhamnosus* CCM 1825 na hydrolyzátu matolin v bioreaktoru. Hydrolyzát byl přefiltrován a byl přidán kvasničný extrakt o koncentraci  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Takto připraveným médiem byl naplněn sterilní bioreaktor. Médium nebylo znova sterilizováno, aby nedocházelo k případným změnám ve složení hydrolyzátu. Postup kultivace je blíže popsán v kapitole 4.9.3.1. Časový průběh pH a přidavku neutralizačního činidla v bioreaktoru během kultivace je uveden v Příloze I graf 2.

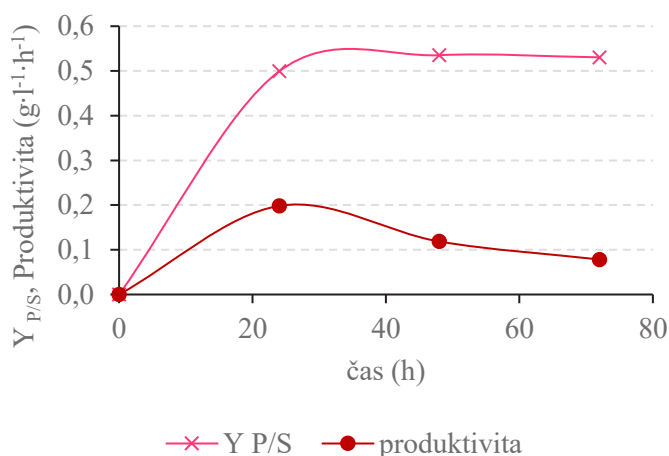
Znázornění časového průběhu nárůstu biomasy, koncentrace kyseliny mléčné a spotřeby jednotlivých sacharidů stanovených v jednotlivých odběrech je shrnuto v Grafu 12. Také v případě hydrolyzátu matolin docházelo k postupnému zpomalení růstu buněk a produkce kyseliny mléčné. Od 48. hodiny již byla koncentrace kyseliny mléčné konstantní a křivka znázorňující množství biomasy se dokonce začínala snižovat. K tomuto jevu došlo s největší pravděpodobností vlivem lyze umírajících buněk. Z dat uvedených v tomto grafu lze tedy usuzovat, že fermentace na hydrolyzátu matolin probíhala po dobu 48 hodin, kdy bylo dosaženo i maximálního výtěžku kyseliny mléčné [57][116].



Graf 12: Množství spotřebovaných sacharidů, vyprodukované kyseliny mléčné a biomasy v bioreaktoru na hydrolyzátu matolin

Fermentací hydrolyzátu matolin pomocí kmene *L. rhamnosus* v bioreaktoru bylo dosaženo  $5,69 \pm 0,66 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny mléčné. Výťažnostní koeficient ( $Y_{P/S}$ ) kyseliny mléčné v 48. hodině byl  $0,54 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  a produktivita  $0,12 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Nejvyšší produktivity však bylo dosaženo ve 24.

hodině, což lze pozorovat i v Grafu 13, kde je znázorněn trend závislosti produktivity a výtěžnostního koeficientu na čase.



Graf 13: Časový průběh produktivity a výtěžnostního koeficientu fermentace hydrolyzátu matolin v bioreaktoru

Maximální produktivity tedy bylo dosaženo v 24. hodině, a to konkrétně  $0,20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Porovnáním výtěžků dosažených při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách bylo dosaženo  $6,07 \pm 0,38 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , což znamená, že kultivacemi v bioreaktoru bylo získáno o  $0,38 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny mléčné méně. Nicméně tento rozdíl je srovnatelný s odchylkou měření u kultivací v Erlenmeyerových baňkách. Lze tedy usuzovat, že bylo dosaženo přibližně stejné koncentrace kyseliny kultivacemi v bioreaktoru jako při kultivacích v baňkách. Produktivita v baňkách činila  $0,13 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , což se od produktivity dosažené v bioreaktoru liší pouze o  $0,01 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . V případě výtěžnostních koeficientů bylo v baňkách dosaženo hodnoty  $0,90 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , zatímco v bioreaktoru to bylo pouze  $0,54 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Dosažený výsledek lze zdůvodnit přítomností poměrně nízkého množství fermentovatelných sacharidů v hydrolyzátu matolin. Zvýšení výtěžku kyseliny mléčné v bioreaktoru by šlo pravděpodobně dosáhnout změnou typu fermentace z vsádkové na přítokovanou (fed-batch) či kontinuální.

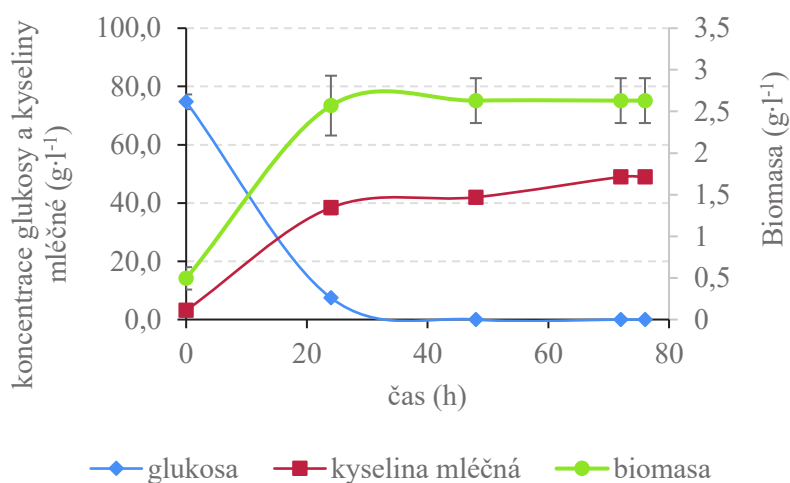
### 5.3.3.3 Fermentace na hydrolyzátu odpadního chleba

Na hydrolyzátu z odpadního chleba byla provedena vsádková kultivace *L. rhamnosus* CCM 1825 v bioreaktoru. Hydrolyzát byl přefiltrován a převeden do předem vysterilizovaného bioreaktoru. Médium nebylo sterilizováno, aby nedocházelo k případným změnám ve složení hydrolyzátu. Podrobný postup kultivace je uveden v kapitole 4.9.3.3. Časový průběh pH a přidavku neutralizačního činidla v bioreaktoru během kultivace je uveden v Příloze I graf 3.

Časový průběh nárůstu biomasy, koncentrace kyseliny mléčné a spotřeby jednotlivých sacharidů je zobrazen v Grafu 14. Na hydrolyzátu odpadního chleba byla koncentrace

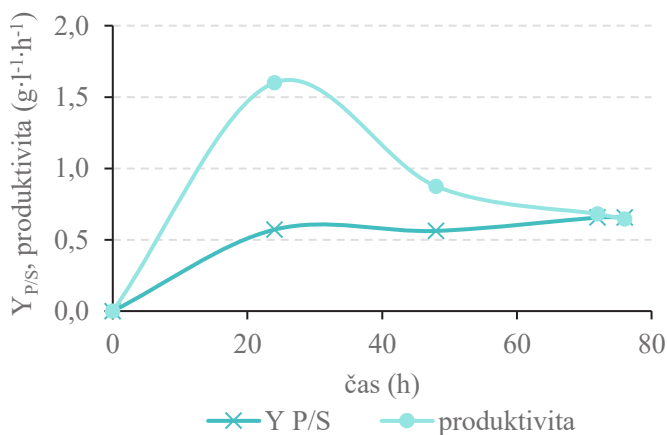


biomasy již od 24. hodiny konstantní. Nicméně koncentrace kyseliny mléčné se stále zvyšovala až do 72. hodiny, kdy pravděpodobně i došlo k ukončení produkce.



Graf 14: Časový průběh množství spotřebovaných sacharidů, vyprodukované kyseliny mléčné a biomasy v bioreaktoru na hydrolyzátu odpadního chleba

Fermentací hydrolyzátu odpadního chleba v bioreaktoru pomocí kmene *L. rhamnosus* bylo dosaženo  $48,97 \pm 1,83 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  kyseliny mléčné. Výtěžnostní koeficient ( $Y_{P/S}$ ) kyseliny mléčné v 72. hodině byl  $0,66 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Produktivita v tomto čase byla  $0,68 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . V Grafu 15 je znázorněn trend závislosti produktivity a výtěžnostního koeficientu na čase.



Graf 15: Časový průběh produktivity a výtěžnostního koeficientu fermentace hydrolyzátu odpadního chleba v bioreaktoru

Maximální produktivity bylo dosaženo v 72. hodině. Porovnáním výtěžků získaných kultivacemi v Erlenmeyerových baňkách bylo získáno v bioreaktoru o  $36,07 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  více

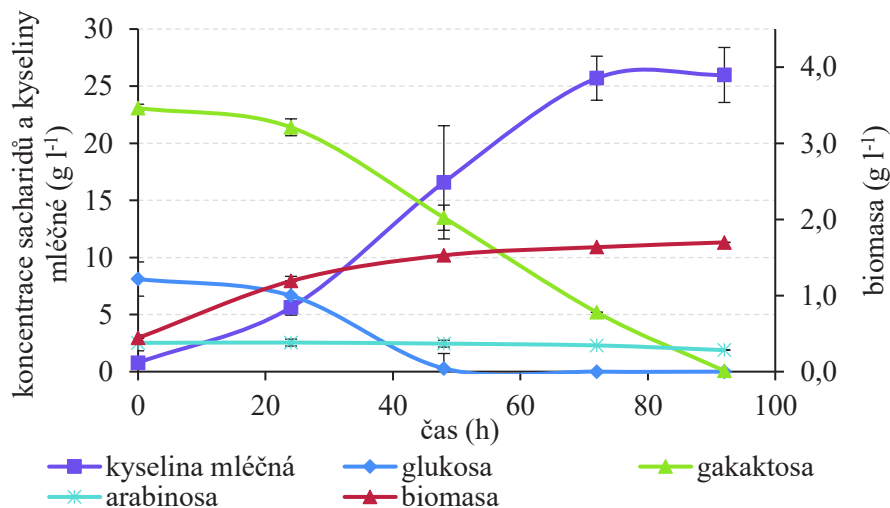
kyseliny mléčné. Produktivita v bioreaktoru se zvýšila z  $0,21 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  na  $0,68 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Výtěžnostní koeficient v bioreaktoru byl také vyšší, a to o  $0,13 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Lze usuzovat, že v případě hydrolyzátu odpadního chleba byla vsádková kultivace v bioreaktoru s kontrolovaným pH úspěšná z hlediska optimalizace a navýšení produkce. Výhodou tohoto substrátu byla především poměrně vysoká koncentrace počátečních sacharidů. V případě tohoto odpadu se jednalo o  $74,73 \pm 2,53 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  glukosy, což činí tento odpad jako velmi vhodný pro bioprodukcí surovin s přidanou hodnotou.

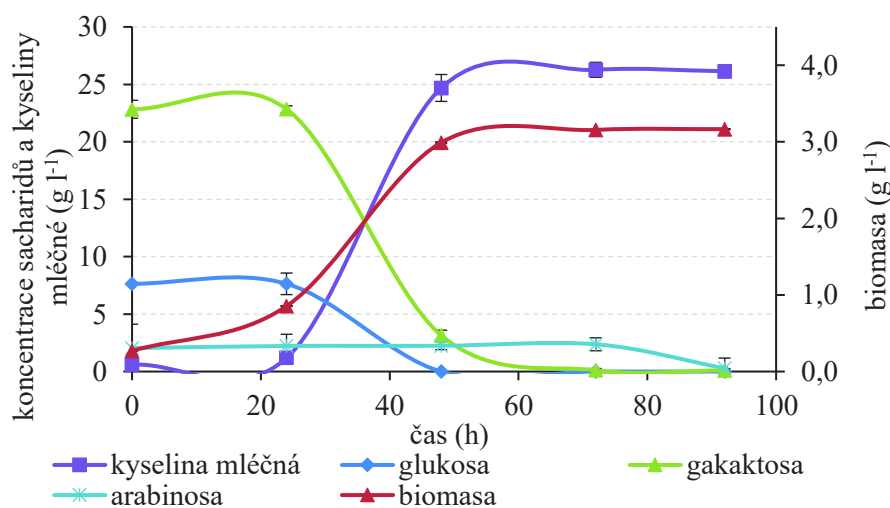
#### 5.3.3.4 Fermentace na hydrolyzátu kávové sedliny

V případě hydrolyzátu kávové sedliny bylo provedeno kromě kultivací kmene *L. rhamnosus* CCM 1825 i kultivace dalších kmenů, a to *L. plantarum* CCM 7039 a *B. coagulans* CCM 2658. Všechny tyto kmeny byly kultivovány na hydrolyzátu kávové sedliny obohaceném o kvasničný extrakt ( $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Před kultivací bylo médium převedeno do sterilního bioreaktoru. Hydrolyzát kávové sedliny nebyl autoklávován s bioreaktorem vzhledem k možným změnám ve složení hydrolyzátu. Kmen *L. rhamnosus* byl dále kultivován také na hydrolyzátu kávové sedliny bez přídavku kvasničného extraktu a na MRS médiu se sacharidickým složením podobným hydrolyzátu kávové sedliny ( $6,75 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  glukosy,  $19,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  galaktosy a  $2,25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  arabinosy), aby byl zjištěn efekt inhibičních látek vyskytujících se v kávové sedlině. Postupy jednotlivých kultivací v bioreaktorech jsou blíže popsány v kapitole 4.9.3.4.

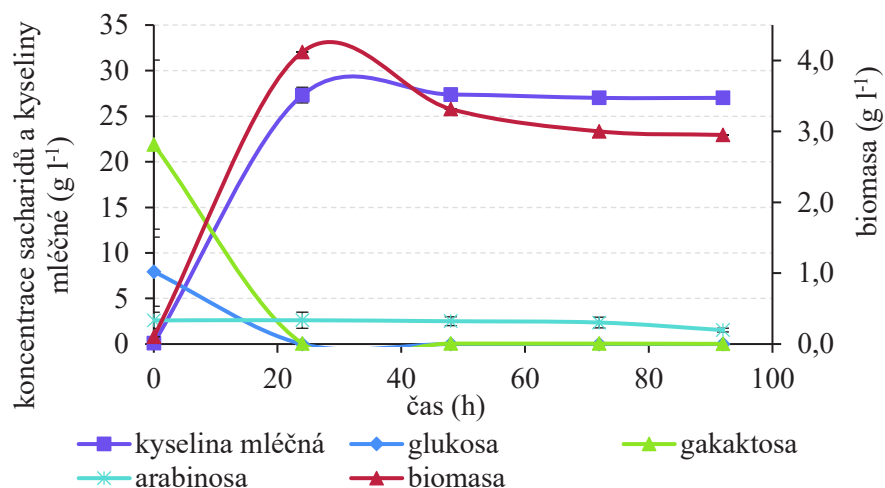
V následujících grafech (Grafy 16 až 18) jsou znázorněny časové průběhy jednotlivých kultivací *L. rhamnosus* na hydrolyzátu s přídavkem a bez přídavku kvasničného extraktu a na syntetickém médiu. Časové průběhy pH a přídavku neutralizačního činidla v bioreaktoru během kultivace jsou uvedeny v Příloze I grafy 6 až 8.



Graf 16: Časový průběh spotřeby sacharidů, biomasy a koncentrace kyseliny mléčné během kultivace *L. rhamnosus* na hydrolyzátu kávové sedliny v bioreaktoru



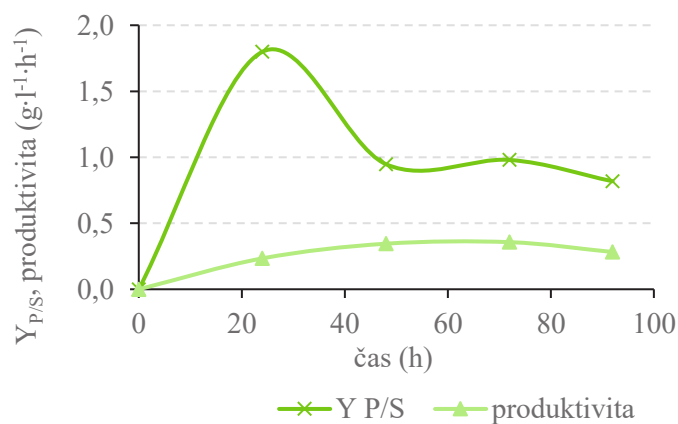
Graf 17: Časový průběh spotřeby sacharidů, biomasy a koncentrace kyseliny mléčné během kultivace *L. rhamnosus* na hydrolyzátu kávové sedliny s přidavkem kvasničného extraktu v bioreaktoru



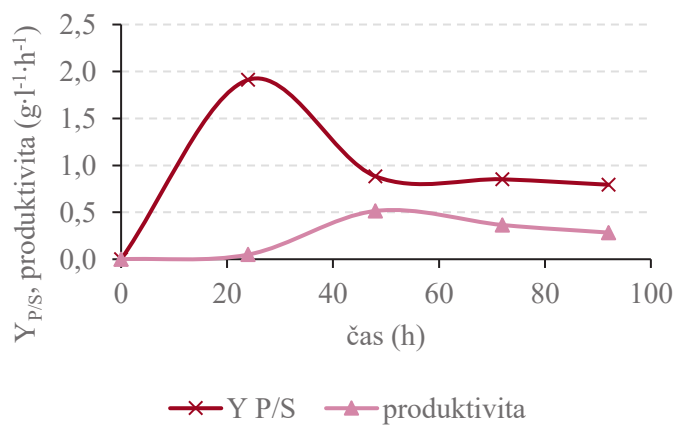
Graf 18: Časový průběh spotřeby sacharidů, biomasy a koncentrace kyseliny mléčné během kultivace *L. rhamnosus* na MRS v bioreaktoru

Porovnáním dynamiky produkce kyseliny mléčné je evidentní, že přidavek kvasničního extraktu k hydrolyzátu kávové sedliny urychlil průběh fermentace. V tomto případě lze pozorovat, že maximální koncentrace kyseliny mléčné bylo v případě suplementovaného hydrolyzátu dosaženo asi po 48. hodině (Graf 17), zatímco v hydrolyzátu bez přídavku kvasničního extraktu bylo maximální koncentrace kyseliny mléčné dosaženo po 72. hodině (Graf 16). Je také velmi pravděpodobné, že inhibitory v hydrolyzátu kávové sedliny částečně inhibují vybraný bakteriální kmen, protože fermentace v syntetickém médiu byla nejrychlejší a maximální koncentrace kyseliny mléčné bylo dosaženo již po 24 hodinách kultivace. Růst bakteriálního kmene na syntetickém médiu byl po tomto čase prakticky ukončen (Graf 18). Od 24. hodiny byly také spotřebovány přítomné fermentovatelné sacharidy a vzhledem k postupnému snižování koncentrace biomasy lze usuzovat, že od tohoto času začly buňky postupně lyzovat. Z fermentace syntetického média bylo také evidentní, že nebyla využívána arabinosa. Důvodem byla neschopnost vybraného kmene *L. rhamnosus* arabinosu využít [118].

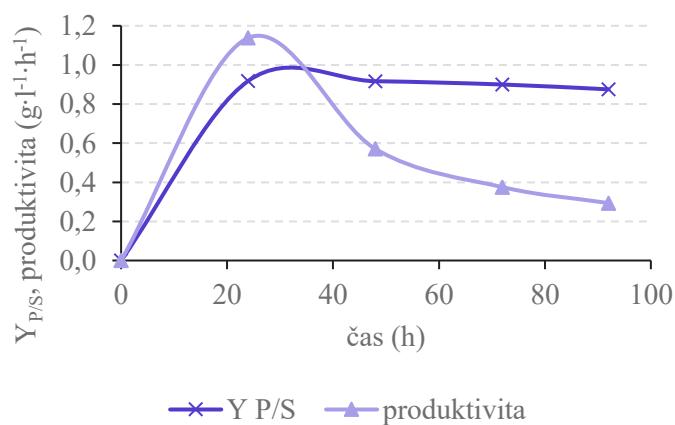
Byly také sestaveny grafy závislostí produktivity a výtěžnostních koeficientů na čase, ze kterých je evidentní, že při fermentaci kávové sedliny byla maximální produktivita kolem 48. hodiny a výtěžnostní koeficient byl na maximální hodnotě okolo 24. hodiny (Graf 19). V případě hydrolyzátu s přídavkem kvasničního extraktu (Graf 20) byl trend podobný jako u hydrolyzátu bez suplementace. V případě syntetického média dosahoval výtěžnostní koeficient i produktivita maxima ve 24. hodině (Graf 21).



Graf 19: Časový průběh produktivity a výtěžnostního koeficientu na hydrolyzátu kávové sedliny pomocí *L. rhamnosus*



Graf 20: Časový průběh produktivity a výtěžnostního koeficientu na hydrolyzátu kávové sedliny s přidavkem kvasničného extraktu pomocí *L. rhamnosus*



Graf 21: Časový průběh produktivity a výtěžnostního koeficientu na syntetickém médiu pomocí *L. rhamnosus*

Při porovnání získaných výtěžků z jednotlivých kultivací (Tabulka 16) bylo zjištěno, že jsou si velmi podobné a rozdíly mezi nimi nejsou statisticky významné. Lze tedy konstatovat, že suplementace kultivačního média kvasničným extraktem není nutná k dosažení vyššího množství kyseliny mléčné. V rámci celkového ekonomického vyhodnocení procesu bude nutné rozhodnout, zda náklady vzniklé přidáním kvasničného extraktu mohou být kompenzovány zkrácením doby fermentace. Lze také usuzovat, že přítomnost inhibitorů v hydrolyzátu kávové sedliny nemá negativní vliv na výtěžnost kyseliny mléčné, jelikož dosažené koncentrace kyseliny mléčné a stejně tak i výtěžnostní koeficienty jsou srovnatelné. Nicméně lze předpokládat, že použitím vhodných detoxifikačních metod pro odstranění inhibičních látek z hydrolyzátu kávové sedliny, by se mohla zkrátit doba fermentace. Například *Obruca a kol. 2014* detoxikoval kávovou sedlinu před hydrolýzou ethanolovou extrakcí polyfenolů [23]. Tímto způsobem byly upraveny výtěžky biotechnologického procesu produkce polyhydroxyalkanoátů o 30 %, navíc však i byl získán extrakt polyfenolů jako vedlejší produkt s možným dalším využitím [23].

Tabulka 16: Produkce kyseliny mléčné pomocí *L. rhamnosus* v bioreaktoru

substrát	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	spotřebované sacharidy (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	čas dosažení maximálního výtěžku (h)
hydrolyzát	25,69 ± 1,45	26,22	0,98	0,34	76
hydrolyzát + kvasničný extrakt	26,26 ± 0,65	30,22	0,85	0,38	70
syntetické médium	27,29 ± 0,64	30,02	0,91	0,57	48

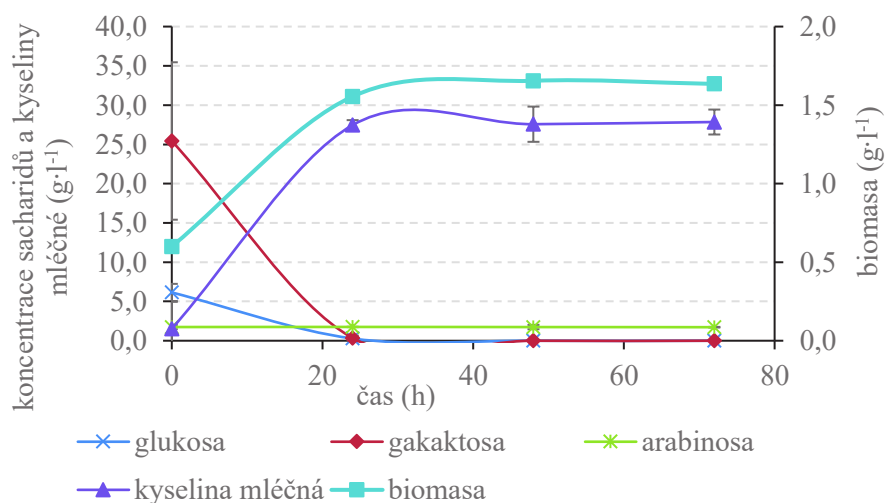
Z výsledků je patrné, že hydrolyzát kávové sedliny je vhodným substrátem pro produkci kyseliny mléčné kmenem *L. rhamnosus* CCM 1825. Koncentrace kyseliny mléčné a zejména výtěžnostní koeficienty jsou více než srovnatelné s výsledky publikovanými jinými autory, kteří používali kmen *L. rhamnosus* a substráty na bázi lignocelulosy pro produkci kyseliny mléčné. Srovnání dosažených výtěžků s výsledky jiných publikací je uvedeno v Tabulce 17. Je třeba především zdůraznit, že hydrolyzát kávové sedliny není třeba dále doplňovat například kvasničným extraktem či jinými drahými substrátovými komplexy, protože rozdíl mezi suplementovaným a nesuplementovaným hydrolyzátem nebyl tak významný.

Tabulka 17: Srovnání produkce kyseliny mléčné na různé lignocelulosové biomase [119][120][121][122]

Microorganismus	substrát	proces fermentace	suplementace	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g·g <sup>-1</sup> )	reference
<i>Lbc. casei subsp. rhamnosus</i> ATCC 10863	měkké dřevo	vsádková	-	21,1 – 23,75	0,74 – 0,83	Iyer et al. (2000)
<i>Lbc. rhamnosus</i> ATCC 7469	papírový kal	vsádková SSF	*	73,0	0,97	Marques et al. (2008)
<i>Lbc. rhamnosus</i> ATCC 9595	jablečné výlisky	vsádková	*	32,5	0,88	Gullon et al. (2008)
<i>Lbc. rhamnosus</i> ATCC 9595 (CECT288)	celulosa kal	SSF	*	39,4	0,36	Romani et al. (2008)
<i>Lbc. Rhamnosus</i> ATCC 7469 (CCM 1825)	kávoval sedlina	vsádková	-	25,69	0,98	tato práce

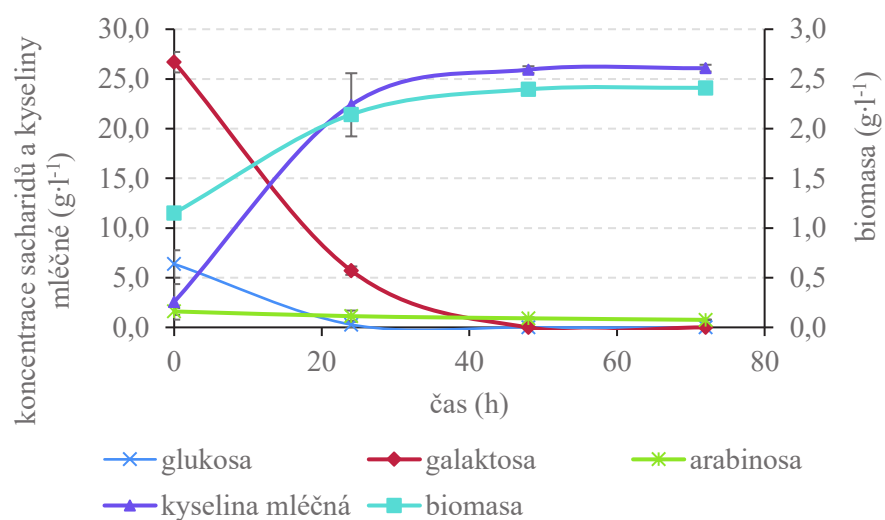
\* obohaceno látkami obsaženými v MRS médiu mimo glukosu

V následujících grafech (Grafy 22 a 23) jsou průběhy kultivací *B. coagulans* CCM 2658 a *L. plantarum* CCM 7039 na hydrolyzátu kávové sedliny obohaceném o kvasničný extrakt (3 g·l<sup>-1</sup>). Časový průběh výtěžnostních koeficientů a produktivit během kultivací *B. coagulans* a *L. plantarum* v bioreaktorech jsou znázorněny v Grafech 24 a 25. Časové průběhy pH a přidavku neutralizačního činidla v bioreaktoru během kultivace jsou uvedeny v Příloze I grafy 4 a 5.

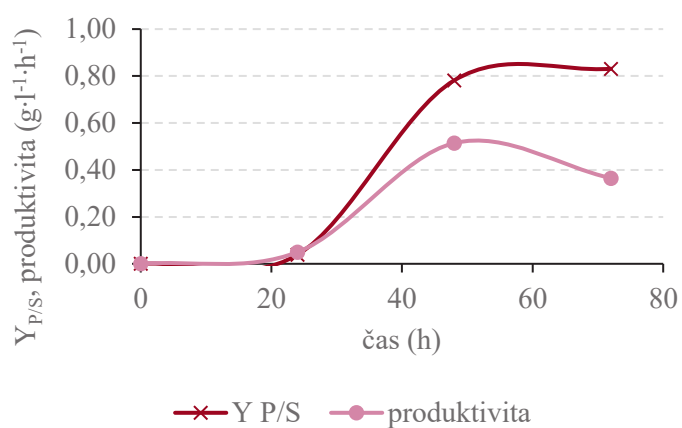


Graf 22: Časový průběh spotřeby sacharidů, biomasy a koncentrace kyseliny mléčné během kultivace *B. coagulans* na hydrolyzátu kávové sedliny v bioreaktoru

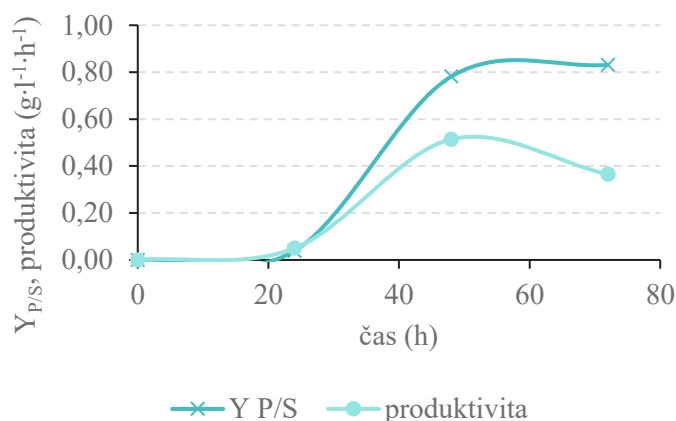




Graf 23: Časový průběh spotřeby sacharidů, biomasy a koncentrace kyseliny mléčné během kultivace *L. plantarum* na hydrolyzátu kávové sedliny v bioreaktoru



Graf 24: Časový průběh produktivity a výtěžnostního koeficientu na hydrolyzátu kávové sedliny pomocí *B. coagulans*



Graf 25: Časový průběh produktivity a výtěžnostního koeficientu na hydrolyzátu kávové sedliny pomocí *L. plantarum*

V obou případech po 24. hodině docházelo ke zpomalení růstu biomasy a produkce kyseliny mléčné. Okolo 48. hodiny již bylo dosaženo maximální koncentrace kyseliny mléčné a množství biomasy se již také neměnilo. Můžeme zde pozorovat podobný trend průběhu fermentace jako u kmene *L. rhamnosus*. Lze tedy předpokládat, že i u těchto kmenů bychom pozorovali podobný trend na hydrolyzátu bez suplementace kvasničným extraktem, který byl přidán do média právě z důvodu urychlení procesu produkce kyseliny mléčné a utilizace sacharidů přítomných v hydrolyzátu kávové sedliny. Porovnání výtěžků kyseliny mléčné, výtěžnostních koeficientů a produktivity u jednotlivých kmenů (Tabulka 18) bylo zjištěno, že nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo kmenem *L. rhamnosus*. Nejvyšší produktivity a koncentrace kyseliny mléčné však bylo dosaženo kmenem *B. coagulans*. Nicméně rozdíly mezi koncentracemi kyseliny mléčné získanými jednotlivými kmeny nejsou příliš statisticky významné.

Tabulka 18: Porovnání produkcí kyseliny mléčné na hydrolyzátu kávové sedliny kultivacemi různých producentů v bioreaktu

mikroorganismus	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l <sup>-1</sup> )	množství kyseliny mléčné (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>B. coagulans</i> CCM 2658	31,60	27,57 ± 2,24	0,88	0,57
<i>Lbc. rhamnosus</i> CCM 1825	26,14	26,26 ± 0,65	0,98	0,55
<i>Lbc. plantarum</i> CCM 7039	33,91	26,08 ± 0,34	0,77	0,54

Z výsledků lze tedy usuzovat, že hydrolyzát kávové sedliny je utilizovatelný vybranými bakteriálními kmeny produkujícími kyselinu mléčnou. Jednotlivé kmeny vyprodukovaly prakticky srovnatelné koncentrace kyseliny mléčné, výběr producenta pro případné další aplikace je tedy závislý na požadavku na konečný produkt, především tedy na optickou

čistotu a druh izomeru kyseliny mléčné. Z vybraných kmenů jsou *L. rhamnosus* a *B. coagulans* schopny produkce velice čistých L(+) optických izomerů kyseliny mléčné, které dále není nutno po izolaci z média přečišťovat či oddělovat. Zatímco kmen *L. plantarum* produkuje racemickou směs L(+) a D(-) izomerů kyseliny mléčné [54][110][112].

Taková valorizace kávové sedliny dokonale vyhovuje tzv. koncepci biorafinérii, která je založena na efektivním a úplném využití biomasy, v tomto případě kávových zrn. Ty mohou být použity pro přípravu rozpustné kávy a zbytkový pevný odpad (kávová sedlina) lze dále použít ve stejném závodě pro výrobu různých cenných látek, materiálů a paliv. Experimenty bylo prokázáno, že produkce kyseliny mléčné z hydrolyzátu kávové sedliny může být považována za velmi nadějný a vhodný proces, který může být dále začleněn do konceptu biorafinérie kávy. [17][123][124]

#### 5.3.3.5 Porovnání produkce kyseliny mléčné pomocí *L. rhamnosus* na jednotlivých odpadech v bioreaktoru

Na závěr této kapitoly byly porovnány (Tabulka 19) výtěžky, výtěžnostní koeficienty a produktivita kyseliny mléčné získané kultivacemi kmene *L. rhamnosus* v bioreaktorech na hydrolyzátech vybraných odpadů z potravinářských výrob. Nejvyšší výtěžek a produktivita kyseliny mléčné byla získána fermentací hydrolyzátu odpadního chleba. Tento výsledek je především z důvodu vysokého obsahu fermentovatelných sacharidů ( $74,73 \pm 2,53 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  glukosy) v tomto hydrolyzátu. Nejvyššího výtěžnostního koeficientu však bylo dosaženo v případě hydrolyzátu kávové sedliny. Nejnižší produktivita a koncentrace kyseliny mléčné byla dosažena fermentací hydrolyzátu matolin, což vychází především z nízkého obsahu fermentovatelných sacharidů v tomto substrátu.

Tabulka 19: Produkce kyseliny mléčné na různých substrátech v bioreaktoru pomocí *L. rhamnosus* CCM 1825

druh substrátu	počáteční množství sacharidů ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	množství kyseliny mléčné ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$	produktivita ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
matoliny	$10,91 \pm 0,11$	$5,69 \pm 0,66$	0,54	0,12
pomerančové slupky	$58,30 \pm 1,08$	$27,20 \pm 1,72$	0,52	0,57
kávová sedlina	$36,09 \pm 0,09$	$26,26 \pm 0,65$	0,98	0,55
odpadní chléb	$74,73 \pm 2,53$	$48,97 \pm 1,83$	0,66	0,68

Z výsledků je patrné, že všechny testované vybrané odpady z potravinářských výrob jsou utilizovatelné kmenem *L. rhamnosus*.

Získané výtěžky z vsádkových kultivací v bioreaktoru by mohly být dále navýšeny použitím přítokovaného (fed-batch) či kontinuálního procesu fermentace. Nicméně nejúčinnějším při produkci kyseliny mléčné by bylo využití membránově-recyklačního

bioreaktoru, který by umožnil současné získávání kyseliny mléčné a recyklaci bakteriálních buněk, což by zvýšilo kapacitu a výtěžek při vyšších koncentracích biomasy a zabránilo by se inhibici procesu produktem [14][125].

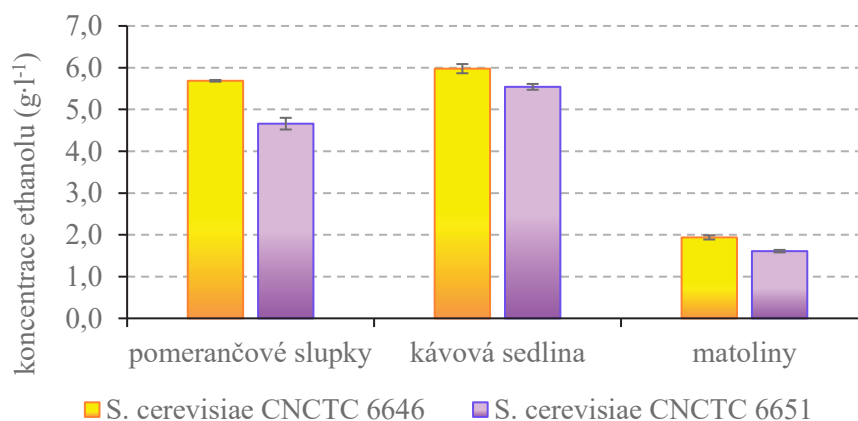
## 5.4 Produkce ethanolu

Tato kapitola se zabývá možností produkce ethanolu na hydrolyzátech vybraných odpadů z potravinářských výrob, které byly vybrány i pro experimenty zaměřené na utilizaci těchto odpadů na kyselinu mléčnou. První část experimentů se věnovala kultivacím dvou vybraných kmenů rodu *Saccharomyces* v Erlenmeyerových baňkách na jednotlivých hydrolyzátech. Druhá část experimentů byla věnována produkci ethanolu v bioreaktoru s použitím té kombinace producenta a substrátu, se kterými v předcházejících experimentech bylo dosaženo nejvyšší koncentrace ethanolu.

### 5.4.1 Produkce ethanolu v baňkách

Pro produkci ethanolu na vybraných odpadech byly testovány 2 kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, a to CNCTC 6646 a CNCTC 6651. Jako substrát byly použity hydrolyzáty matolin, pomerančových slupek a kávové sedliny. Postup přípravy jednotlivých hydrolyzátů je uveden v kapitole 4.7. Postup kultivací je blíže popsán v kapitole 4.10.1.

Porovnáním dosažených koncentrací ethanolu na jednotlivých hydrolyzátech (Graf 26) bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace ethanolu vyprodukoval kmen *S. cerevisiae* CNCTC 6646 na hydrolyzátu kávové sedliny.



Graf 26: Porovnání produkce ethanolu vybranými producenty na jednotlivých hydrolyzátech

Při srovnání použitých kmenů na jednotlivých hydrolyzátech lze pozorovat, že vyšší výtěžky ethanolu byly získány u kmene *S. cerevisiae* CNCTC 6646. Nicméně rozdíly v případě hydrolyzátů kávové sedliny a matolin nejsou příliš významné. V Tabulce 20 jsou

kromě konkrétních hodnot dosažených koncentrací ethanolu uvedeny i výtěžnostní koeficienty a produktivity jednotlivých procesů.

Tabulka 20: Produktivita a koncentrace ethanolu na jednotlivých hydrolyzátech

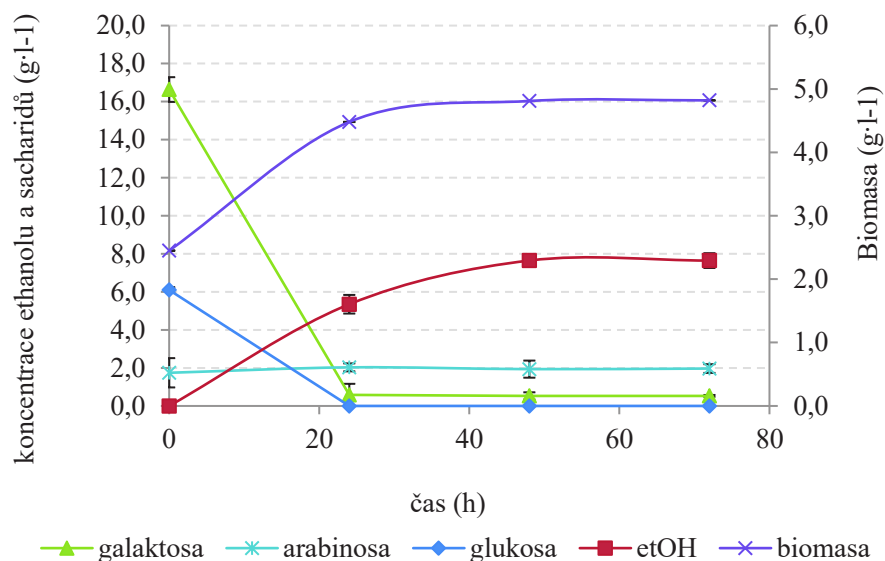
Mikroorganismus/ substrát	množství ethanolu (g·l <sup>-1</sup> )	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	produktivita (g·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>S. cerevisiae</i> CNCTC 6646				
pomerančové slupky	5,69 ± 0,02	46,30	0,12	0,12
káвовá sedlina	5,98 ± 0,11	28,81	0,21	0,12
matolína	1,94 ± 0,05	5,77	0,34	0,04
<i>S. cerevisiae</i> CNCTC 6651				
pomerančové slupky	4,66 ± 0,14	48,15	0,10	0,10
káвовá sedlina	5,54 ± 0,07	28,64	0,19	0,12
matolína	1,61 ± 0,03	6,20	0,26	0,03

Je patrné, že nejvyšší koncentrace ethanolu bylo dosaženo kmenem *S. cerevisiae* CNCTC 6646 na hydrolyzátu kávové sedliny. Tento substrát a producent byli proto dále vybráni pro kultivace v bioreaktoru. Nicméně nejvyššího výtěžnostního koeficientu bylo dosaženo stejným kmenem na hydrolyzátu matolin. Podobný jev, tedy nejvyšší výtěžnostní koeficient, byl pozorován také u druhého kmene na hydrolyzátu matolin. Důvod tohoto jevu není zcela jasný, nicméně výpočet výtěžnostního koeficientu nezohledňuje spotřebu sacharidů na růst mikroorganismu. U dalších substrátů, které obsahovaly vyšší počáteční koncentrace fermentovatelných sacharidů docházelo i k vyšší spotřebě, avšak dosažená koncentrace ethanolu nedosahovala výrazně vyšších koncentrací. Lze tedy usuzovat, že v těchto substrátech byla využita část spotřebovaných sacharidů i na růst.

#### 5.4.2 Produkce ethanolu v bioreaktoru

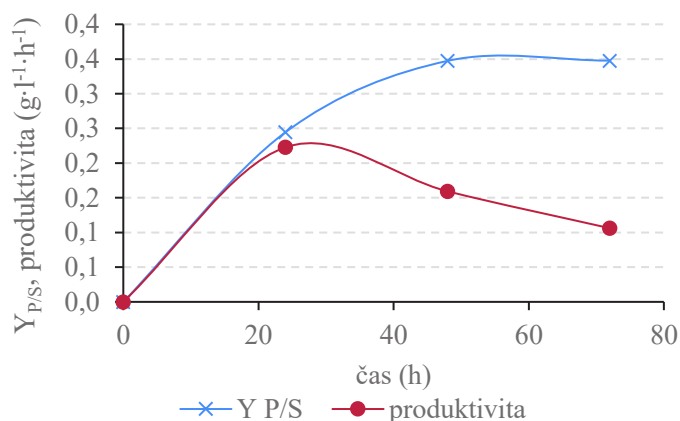
V závistlosti na výsledcích uvedených v předešlé kapitole, byla provedena kultivace *S. cerevisiae* CNCTC 6646 v bioreaktoru na hydrolyzátu kávové sedliny. Postup kultivace v bioreaktoru je uveden v kapitole 4.10.2.

V Grafu 27 je znázorněn průběh produkce ethanolu kmenem *S. cerevisiae* CNCTC 6646 v bioreaktoru na hydrolyzátu kávové sedliny.



Graf 27: Časový průběh sacharidů, ethanolu a biomasy v bioreaktoru

Z časového trendu kultivace je patrné, že po 24. hodině se již nárůst ethanolu a spotřeba sacharidů příliš razantně neměnila a od 48. hodiny koncentrace biomasy a produktu stagnovala. Fermentací na hydrolyzátu kávové sedliny v bioreaktoru bylo dosaženo výtěžku  $7,64 \pm 0,39 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  ethanolu. Výtěžnostní koeficient činil  $0,35 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  a produktivita v 48. hodině byla  $0,16 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Porovnáním s výsledky dosaženými kultivacemi v baňkách, byla koncentrace ethanolu zvýšena o  $1,66 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Výtěžnostní koeficient se navýšil o  $0,14 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  a produktivita o  $0,04 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Z časového průběhu výtěžnostního koeficientu a produktivity (Graf 28) lze pozorovat, že výtěžnostní koeficient rostl do 48. hodiny a produktivita byla nejvyšší ve 24. hodině a následně začla klesat.



Graf 28: Časový průběh výtěžnostních koeficientů a produktivity ethanolu v bioreaktoru

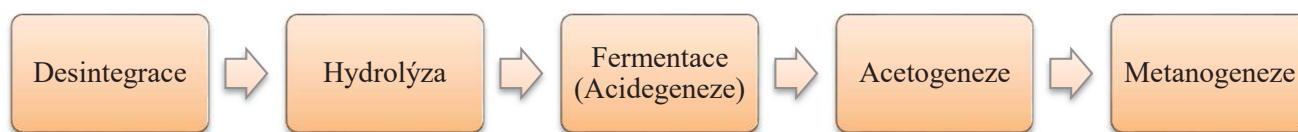
Mussatto a kol. uvádí výtěžek  $11,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  ethanolu a výtěžnostní koeficient  $0,26$  [20]. Námi získané množství ethanolu bylo sice nižší, nicméně výtěžnostní koeficient byl vyšší. Rozdíl

vzniklých koncentrací ethanolu může být způsoben i použitím rozdílného kmene *S. cerevisiae* [20][126].

Podobně jako u produkce kyseliny mléčné by mohly být získané výtěžky ethanolu z vsádkových kultivací v bioreaktoru dále navýšeny použitím přítokovaného (fed-batch) či kontinuálního procesu fermentace. [126][127][128]

### 5.5 Mikroaerační podmínky pro zvýšení produkce organických kyselin

Tato část práce byla naměřena v rámci zahraniční stáže na ZHAW (Zurich University of Applied Sciences) ve Švýcarsku. V rámci této stáže byl zkoumán vliv různého množství přidaného kyslíku na zvýšení produkce organických kyselin během acidogenní fáze anaerobní digesce. Nalezením vhodného režimu vzdušnění vytvářejícím mikroaerobní podmínky by mělo docházet k inhibici nežádoucích mikroorganismů ve fázi acidogeneze a acetogeneze. Zároveň také dochází k inhibičnímu účinku na metanogenní mikroorganismy a zvýšení množství organických kyselin s krátkým řetězcem, především kyseliny octové. Přidáním menšího množství kyslíku do média může dojít ke zvýšení množství vyprodukovaného methanu během anaerobní digesce. *Gerritse a kol.* dokonce uvádí navýšení produkce methanu až o 20 % [65][129][130][131][132].



Obrázek 9: Fáze procesu anaerobní digesce lignocelulosových materiálů [65]

Bylo zkoušeno několik režimů vzdušnění a přidaného kyslíku během vsádkové (batch) kultivace a následně s nejúčinnějším režimem vzdušnění bylo provedeno několik přítokovaných (fed-batch) a kontinuálních fermentací v modelovém bioreaktoru. Postupy jednotlivých experimentů jsou blíže popsány v kapitole 4.11.1.

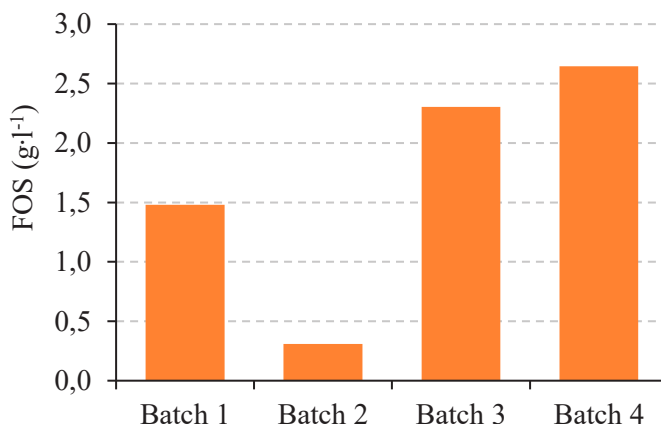
#### 5.5.1 Vsádkové kultivace

Byla vytvořena 1% suspenze otrub (substrát) a anaerobního kalu z čističky odpadních vod (inokulum). Tato suspenze byla využívána pro jednotlivé experimenty zkoumající vliv kyslíku na produkci organických kyselin. Celkem byly provedeny 4 druhy vsádkových (batch) fermentací v bioreaktoru za různých režimů vzdušnění (viz kapitola 4.11.1.1). Časové průběhy pH, redoxního potenciálu a rozpuštěného kyslíku vsádkových fermentací jsou zobrazeny v Příloze II grafy 1 až 4.

Z jednotlivých fermentací byly porovnány hodnoty FOS („Flüchtige organische Säuren“ – množství organických kyselin) naměřené v 72. hodině fermentace. Tento čas byl zvolen pro



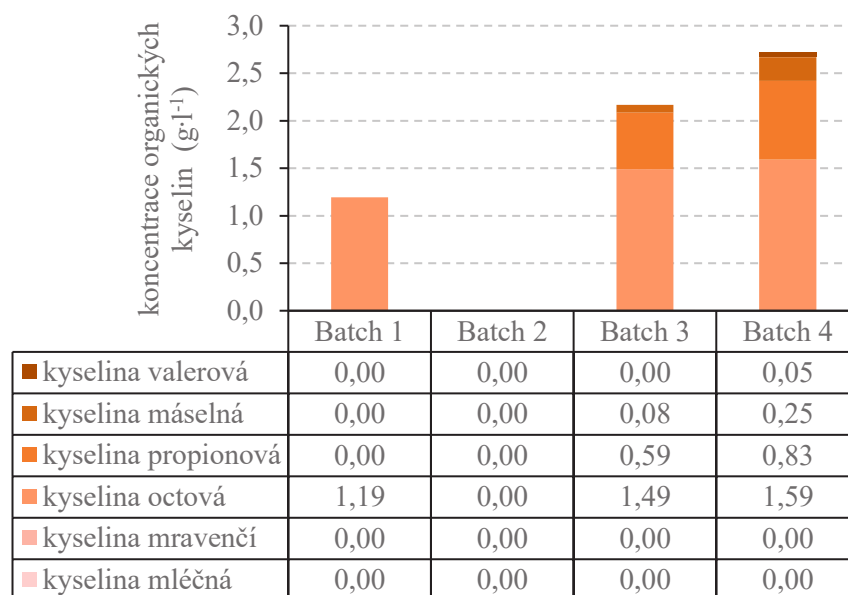
porovnání účinností jednotlivých fermentací v jednom čase, nicméně časy dosažení maximálních hodnot se mezi jednotlivými vsádkovými kultivacemi lišily. V případě fermentace s označením „batch 1“ bylo maximální hodnoty FOS dosaženo v 72. hodině, a to  $1479 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . U „batch 2“ to bylo již ve 24. hodině ( $1173 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a s přibývajícím časem tato hodnota klesala. Během fermentace „batch 3“ byla maximální hodnota ( $2400 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) dosažena po 96. hodinách. Poslední „batch 4“ fermentace dosahovala maximální hodnoty FOS ( $3470 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) po 144. hodině. Jednotlivé hodnoty FOS a TAC naměřeny v průběhu vsádkových fermentací jsou uvedeny v Příloze II tabulky 3, 6, 9 a 12.



*Graf 29: Porovnání obsahu organických kyselin (FOS) během jednotlivých vsádkových (batch) kultivací*

Ačkoliv nebyly porovnávány maximální dosažené výtěžky organických kyselin, podle hodnot naměřených v 72. hodině lze konstatovat stejné poznatky. Porovnáním jednotlivých hodnot FOS dosažených v 72. hodině (Graf 29) lze pozorovat, že nejúčinnější z hlediska produkce organických kyselin byla kultivace „batch 4“. Během této fermentace byl zvolen režim 81 minut pauza a 30 s vzdušnění.

Byly porovnávány i koncentrace jednotlivých organických kyselin naměřených pomocí HPLC (Graf 30). Bylo zjištěno, že naměřené hodnoty FOS odpovídaly součtu jednotlivých organických kyselin, což je pozitivním poznatkem z hlediska používání titrační metody pro rychlou kontrolu účinnosti procesu a také z hlediska ekonomického.



*Graf 30: Porovnání množství a složení organických kyselin vzniklých během vsádkových (batch) kultivací*

Z analýzy organických kyselin je nejdůležitější kyselinou pro následnou fázi metanogeneze kyselina octová. Z porovnání jednotlivých fermentací je patrné, že nejvyšší množství kyseliny octové bylo vyprodukováno během „batch 4“. Vyššího množství organických kyselin však bylo dosaženo po 144 hodinách kultivace, a to 2,15 g·l<sup>-1</sup> kyseliny octové, 0,99 g·l<sup>-1</sup> kyseliny propionové, 0,23 g·l<sup>-1</sup> kyseliny másečné a 0,05 g·l<sup>-1</sup> kyseliny valerové. Jednotlivé hodnoty organických kyselin naměřeny v průběhu vsádkových fermentací jsou uvedeny v Příloze II tabulky 1, 4, 7 a 10.

Během jednotlivých fermentací bylo měřeno i množství plynů vznikajících v bioreaktoru nad médiem. Porovnáním jednotlivých fermentací v 72. hodině (Graf 31) bylo zjištěno, že koncentrace kyslíku nad médiem byla u všech fermentací skoro stejná. Koncentrace oxidu uhličitého se mezi fermentacemi příliš nelišila, nicméně v případě „batch 4“ byla skoro trojnásobná oproti ostatním fermentacím. Pravděpodobně je to způsobeno respirací buněk přítomných v anaerobním kalu, které tento plyn produkovaly. V případě této fermentace také docházelo ke vzniku metanu, což signalizovalo pravděpodobně vhodně zvolené množství přidaného vzduchu a aktivitu metanogenních mikroorganismů. Jednotlivé hodnoty množství vznikajících plynů naměřeny v průběhu vsádkových fermentací jsou uvedeny v Příloze II tabulky 2, 5, 8 a 11.

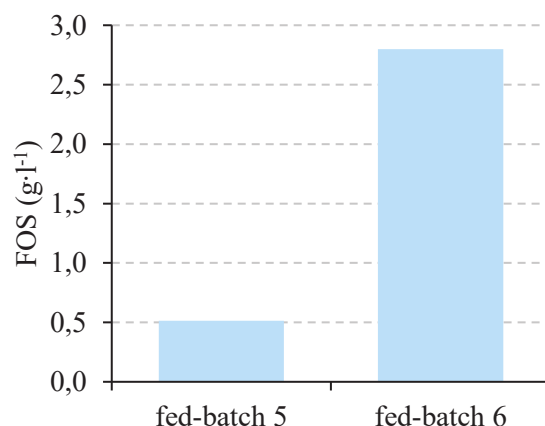


Graf 31: Porovnání složení plynů vznikajících během vsádkových (batch) kultivací v bioreaktoru nad médiem

### 5.5.2 Přítokované (fed-batch) kultivace

Tak jako u vsádkových kultivací byla vytvořena 1% suspenze otrub (substrát) a anaerobního kalu z čističky odpadních vod (inokulum). Tato suspenze byla využívána pro jednotlivé experimenty zkoumající vliv kyslíku na produkci organických kyselin. Po 65 hodinách kultivace byl do suspenze přidán substrát, takže konečná koncentrace substrátu v médiu činila 2 %. Celkem byly provedeny 2 druhy přítokovaných (fed-batch) fermentací v bioreaktoru za různých režimů vzdušnění. Postup a režimy vzdušnění jsou blíže popsány v kapitole 4.11.1.2. Časové průběhy pH, redoxního potenciálu a rozpuštěného kyslíku přítokovaných fermentací jsou zobrazeny v Příloze II grafy 5 a 6.

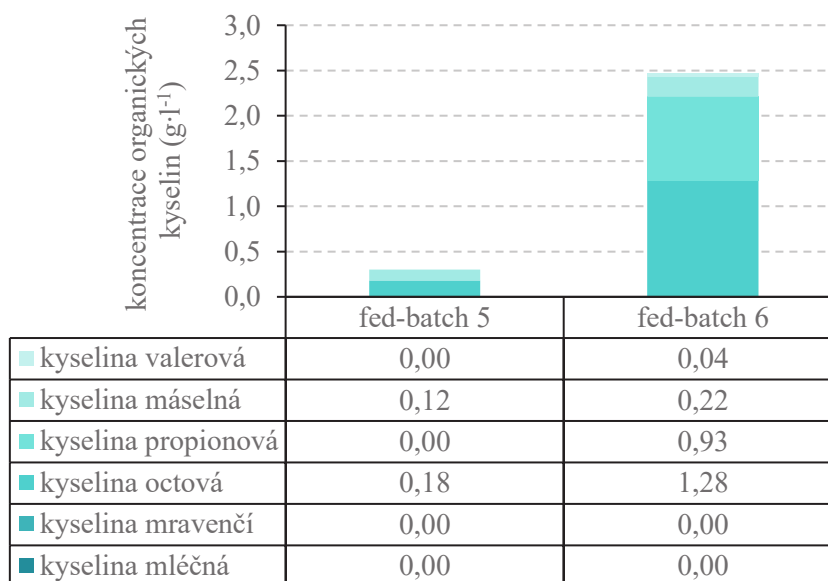
Stejně jako u vsádkových fermentací, byl i u přítokovaných fermentací zvolen pro porovnání jednotlivých měření délka kultivace okolo 70 hodin. Také v případě přítokovaných fermentací bylo dosaženo maximálních hodnot FOS v jiných časech. V případě fermentace s označením „fed-batch 5“ bylo dosaženo maximální koncentrace organických kyseliny ve 24. hodině kultivace, a to  $872 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Během fermentace „fed-batch 6“ bylo maximální koncentrace ( $4675 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) dosaženo okolo 213. hodiny.



*Graf 32: Porovnání obsahu organických kyselin (FOS) během přítokovaných (fed-batch) kultivací*

Porovnáním jednotlivých hodnot FOS dosažených okolo 70. hodiny (Graf 32) lze pozorovat, že nejúčinnější z hlediska produkce organických kyselin byla kultivace „fed-batch 6“. Během této fermentace byl zvolen režim 81 minut pauza a 30 s vzdušnění, který byl nejúčinnějším i v případě vsádkových kultivací. Při průtoku vzduchu 1 V ( $46,57 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  vzduchu  $\sim 0,44 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ O}_2$ ) takové množství odpovídalo 30 ml kyslíku na 1 g biomasy. Jednotlivé hodnoty FOS a TAC naměřeny v průběhu přítokovaných fermentací jsou uvedeny v Příloze II tabulky 15 a 18.

Byly porovnávány i koncentrace jednotlivých organických kyselin naměřených pomocí HPLC (Graf 33). Z analýzy organických kyselin je nejdůležitější kyselinou pro následnou fázi metanogeneze kyselina octová. Z porovnání jednotlivých fermentací je patrné, že nejvyšší množství kyseliny octové bylo vyprodukováno během „fed-batch 6“.



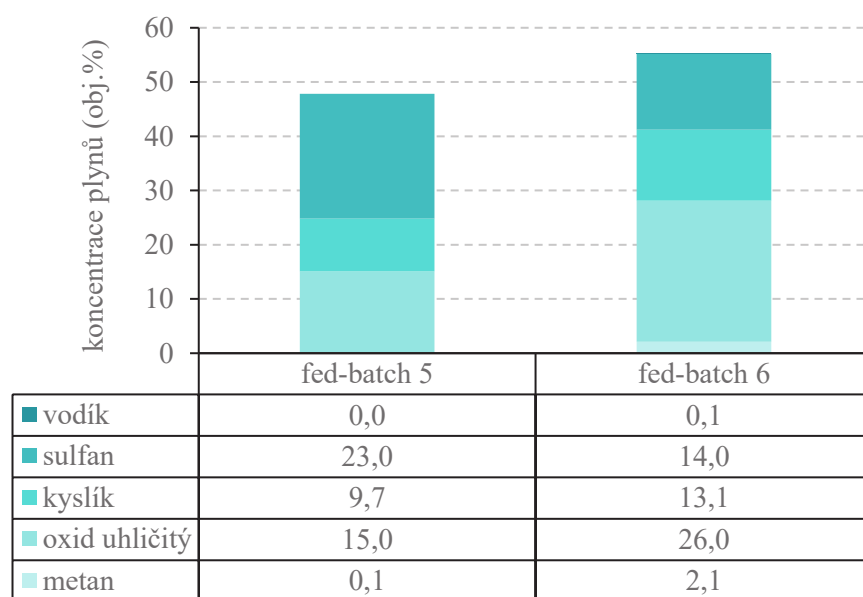
*Graf 33: Porovnání množství a složení organických kyselin vzniklých během přítokovaných (fed-batch) kultivací*

Porovnáním množství organických kyselin získaných při vsádkové kultivaci ve stejném čase bylo zjištěno, že získaná množství jednotlivých organických kyselin byla přibližně stejná. V případě kyseliny propionové bylo při přítokované fermentaci získáno o  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  méně a kyseliny octové o  $0,31 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  méně. Nicméně po delší době kultivace (okolo 213. hodiny) byly již koncentrace těchto kyselin vyšší. Po 213 hodinách přítokované fermentace bylo dosaženo  $2,15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny octové,  $1,59 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny propionové,  $0,50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny máselné a  $0,06 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny valerové. Jednotlivé hodnoty organických kyselin naměřeny v průběhu přítokovaných fermentací jsou uvedeny v Příloze II tabulky 13 a 16.

Během přítokovaných fermentací bylo také měřeno množství plynů vznikajících v bioreaktoru nad médiem. Porovnáním naměřených plynů vznikajících během fermentací okolo 70. hodiny kultivace (Graf 34) bylo zjištěno, že koncentrace jednotlivých plynů se lišily. V případě „fed-batch 5“ docházelo ke vzniku skoro dvojnásobného množství sulfanu, nicméně oxidu uhličitého bylo naopak skoro poloviční množství oproti „fed-batch 6“ fermentaci. V případě kyslíku byla množství skoro srovnatelná. V případě „fed-batch 5“ musela být pro porovnání vznikajících plynů nad médiem použity hodnoty naměřeny v 67. hodině, jelikož následně docházelo k pění média, což bylo způsobeno pravděpodobně špatně zvoleným režimem vzdušnění. Lze předpokládat, že vzdušněním 120 s každé 2 minuty docházelo k přesycení média vzduchem a tím bylo i způsobeno následné pění. Jak již bylo konstatováno, během procesu „fed-batch 5“ vznikalo poměrně vysoké množství sulfanu, což je nežádoucí v procesu anaerobní digesce z hlediska možnost koroze jednotlivých komponent

bioreaktoru a z hlediska inhibice růstu samotných metanogenních mikroorganismů [133][134]. Jednotlivé hodnoty množství vznikajících plynů naměřeny v průběhu přítokovaných fermentací jsou uvedeny v Příloze II tabulky 14 a 17.

Porovnáním přítokovaného procesu se vsádkovým lze pozorovat, že množství kyslíku, oxidu uhličitého a metanu jsou srovnatelná. V případě přítokovaného procesu byl v bioreaktoru přítomen i sulfan, což však mohlo být způsobeno kontaminacemi v použitém anaerobním kalu. Nicméně oproti fermentaci „fed-batch 5“ zde bylo poloviční množství tohoto plynu.



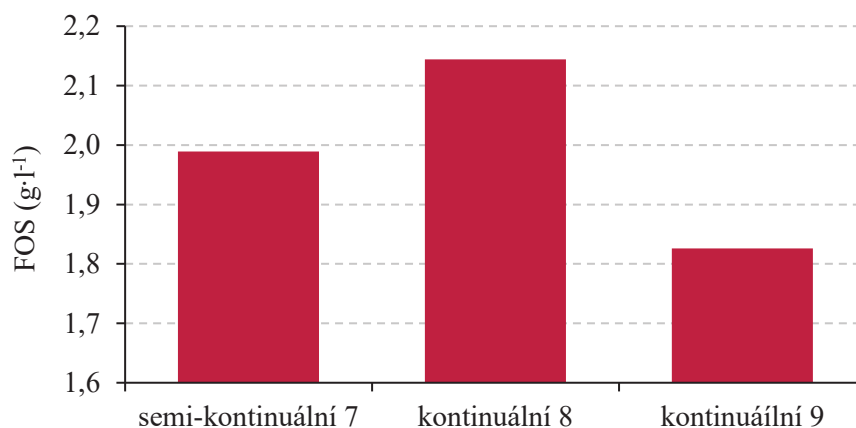
Graf 34: Porovnání složení plynů vznikajících během přítokovaných (fed-batch) kultivací v bioreaktoru nad médiem

### 5.5.3 Kontinuální kultivace

Jako v předešlých procesech byla vytvořena 1% suspenze otrub (substrát) a anaerobního kalu z čističky odpadních vod (inokulum). V případě kontinuálních fermentací byl použit už jen jeden režim vzdušnění, a to 81 minut pauza a 30 s vzdušnění. Tento režim byl zvolen vzhledem k tomu, že během vsádkových a přítokovaných fermentací byl neúčinnější z hlediska produkce organických kyselin. Celkem byly provedeny 1 semi-kontinuální a 2 kontinuální fermentace v bioreaktoru za různých režimů vzdušnění. Postupy jednotlivých fermentací jsou blíže popsány v kapitole 4.11.1.3.

Jako u předešlých procesů, byl i u kontinuálních fermentací zvolen pro porovnání jednotlivých měření celkový čas kultivace okolo 70 hodin. Časy dosažení maximálních koncentrací organických kyselin v případě kontinuálních procesů byly opět rozdílné. Během semi-kontinuální fermentace bylo maximální hodnoty FOS dosaženo ve 49. hodině (2140

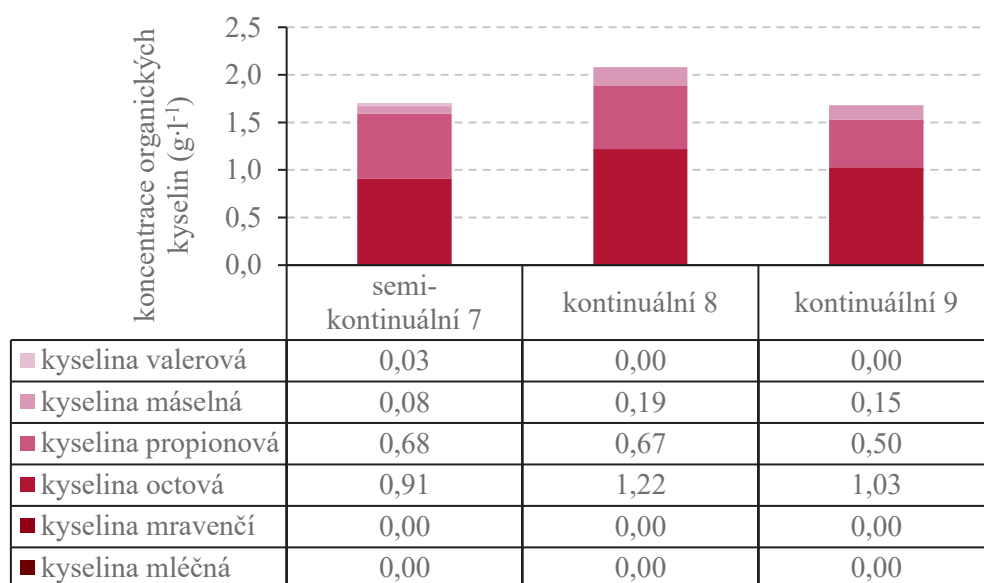
mg·l<sup>-1</sup>). U kontinuální fermentace s označením „kontinuální 8“ bylo maximální hodnoty dosaženo po 125 hodinách kultivace, a to 2301 mg·l<sup>-1</sup>. V případě fermentace „kontinuální 9“ byla maximální koncentrace organických kyselin dosažena již v 45. hodině (1880 mg·l<sup>-1</sup>).



*Graf 35: Porovnání obsahu organických kyselin (FOS) během kontinuálních kultivací*

Porovnáním naměřených hodnot FOS okolo 70. hodiny (Graf 35) je evidentní, že nejvyšších výtěžků organických kyselin bylo dosaženo během fermentace značené jako „kontinuální 8“. Tato fermentace byla prováděna v režimu vypuštění a následného napuštění 667 ml 1 hm.% suspenze kalu a otrub 3krát denně, což odpovídalo výměně 2 l média za den. Jednotlivé hodnoty FOS a TAC naměřeny v průběhu kontinuálních fermentací jsou uvedeny v Příloze II tabulky 21, 24 a 27.

Z porovnání koncentrací jednotlivých organických kyselin z analýzy metodou HPLC (Graf 36) je patrné, že i z hlediska koncentrace kyseliny octové bylo nejvyšší koncentrace dosaženo u procesu „kontinuální 8“.



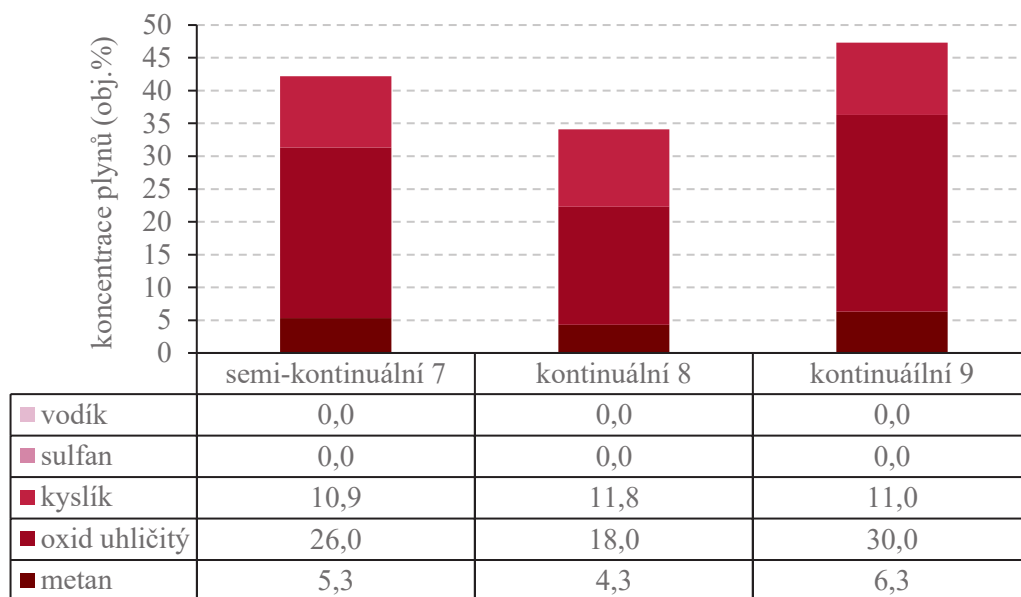
Graf 36: Porovnání množství a složení organických kyselin vzniklých během kontinuálních kultivací

Porovnáním množství organických kyselin získaných získaných během kontinuálního procesu „kontinuální 8“ s přítokovaným „fed-batch 6“ a vsádkovým „batch 4“ v čase kolem 70. hodiny lze pozorovat, že koncentrace jednotlivých kyselin jsou opět velmi podobné. Po 125 hodinách kontinuální fermentace bylo dosaženo maximálních hodnot organických kyselin, a to  $1,36 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  kyseliny octové,  $0,64 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  kyseliny propionové a  $0,16 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  kyseliny máselné. Jednotlivé hodnoty organických kyselin naměřeny v průběhu kontinuálních fermentací jsou uvedeny v Příloze II tabulky 19, 22 a 25.

Taktéž u kontinuálních fermentací bylo souběžně měřeno množství plynů vznikajících v bioreaktoru nad médiem. Porovnáním složení naměřených plynů vznikajících během fermentací okolo 70. hodiny kultivace (Graf 36) bylo zjištěno, že koncentrace jednotlivých plynů se příliš nelišily. Během fermentace „kontinuální 8“ bylo nad médiem asi o 10 % nižší množství oxidu uhličitého než u „semi-kontinuální 7“ a „kontinuální 9“ fermentace. Jednotlivé hodnoty množství vznikajících plynů naměřeny v průběhu kontinuálních fermentací jsou uvedeny v Příloze II tabulky 20, 23 a 26.

Porovnáním kontinuálního, přítokovaného procesu a vsádkového procesu lze pozorovat, že množství kyslíku, oxidu uhličitého a metanu jsou skoro srovnatelná. V případě kontinuálního procesu bylo nad médiem o 2 % více metanu a o 6 % méně oxidu uhličitého.





*Graf 37: Porovnání složení plynů vznikajících během kontinuálních kultivací v bioreaktoru nad médiem*

Během jednotlivých fermentací (vsádkových, přítokovaných a kontinuálních) bylo v bioreaktoru měřeno i množství rozpustěného kyslíku pomocí kyslíkové sondy a pH s redoxním potenciálem. Nicméně bylo zjištěno, že tyto parametry není možno měřit přesně. V případě kyslíkové elektrody docházelo k ovlivnění měření konzumací kyslíku přítomnými mikroorganismy, čímž nebylo možné stanovit přesně koncentrace přidaného kyslíku, proto bylo zvoleno kontrolovat množství přidaného kyslíku výpočtem vstupního množství. V případě pH/redoxní sondy docházelo k ovlivňování měření pufrovací kapacitou anaerobního kalu. Časové průběhy pH, redoxního potenciálu a rozpustěného kyslíku v kontinuálních fermentacích jsou zobrazeny v Příloze II grafy 7 až 9.

#### **5.5.4 Porovnání jednotlivých procesů**

Porovnáním vyprodukovaných maximálních koncentrací organických kyselin během jednotlivých procesů (Tabulka 22) bylo zjištěno, že nejúčinnějším procesem byl přítokovaný „fed-batch 6“.

Tabulka 21: Celkové srovnání maximálních koncentrací organických kyselin dosažených během jednotlivých fermentací

proces	čas (h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
Batch 1	72	0,00	-	1,19	0,27	0,11	0,02
Batch 2	24	-	-	0,98	-	-	-
Batch 3	96	-	-	1,63	0,58	0,03	-
Batch 4	144	-	-	2,15	0,99	0,23	0,05
Fed-batch 5	24	0,01	-	0,51	0,04	0,11	-
Fed-batch 6	213	-	-	2,21	1,59	0,5	0,06
semi- kontinuální 7	49	-	-	0,99	0,69	0,10	0,03
kontinuální 8	125	-	-	1,36	0,64	0,16	-
kontinuální 9	45	-	-	1,05	0,51	0,19	-

Vysoká výtěžnost tohoto procesu může být způsobena především dvojnásobnou koncentrací substrátu v médiu. Dále bylo zjištěno, že pro produkci organických kyselin byl nejvhodnější režim vzdušnění 81 minut pauza a 30 s vzdušnění. Při průtoku vzduchu 1 V (46,57 ml·min<sup>-1</sup> vzduchu ~ 0,44 mmol·min<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>) takové množství vzduchu by mělo odpovídat 30 ml kyslíku na 1 g biomasy. Takové množství kyslíku bylo definováno jako mikroaerobní i v publikaci od *Sawatdeenarunat a kol.* [67].

## 6 Závěr

Předložená disertační práce se zabývá především mikrobiální produkcí kyseliny mléčné a ethanolu s využitím odpadů z potravinářských výroby jako zdroje uhlíku. Pro experimenty byly vybrány odpady z produkce kávy (kávová sedlina), odpady z produkce vína (matoliny) a odpady ze zpracování citrusových plodů (pomerančové slupky).

První část práce je věnována charakterizaci vybraných substrátů, které byly podrobeny metodě NREL. Tato metoda je založena na principu kompletní hydrolýzy materiálu za účelem stanovení množství utilizovatelných sacharidů v daném materiálu. Dále byly stanovovány látky (například polyfenoly, anthokyanová barviva, furfural), které mohou působit inhibičně na růst mikroorganismů.

Po charakterizaci vybrané odpadní biomasy následovaly optimalizace hydrolýz. Jednotlivé odpadní substráty byly před hydrolýzami rozemlety (kromě kávové sedliny), aby byly narušeny struktury přítomných polysacharidů. Následně byly zkoušeny různé kombinace fyzikálních (vysoká teplota), chemických (kyselá, bazická) a enzymatických typů hydrolýz. Bylo zjištěno, že u vybraných substrátů byl nejúčinnějším způsobem hydrolýzy účinek zředěné kyseliny sírové (2,7 hm.%) za vysoké teploty v kombinaci s následnou enzymatickou hydrolýzou. Tato dvoustupňová hydrolýza byla nejúčinnější i vzhledem k tomu, že působení kyseliny za vysoké teploty způsobí rozrušení lignocelulosové struktury a zpřístupnění celulosy a hemicelulosy enzymům. Nejvyššího množství utilizovatelných sacharidů bylo dosaženo hydrolýzou v případě pomerančových slupek ( $60,61 \pm 0,26 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Hydrolýzou kávové sedliny bylo získáno  $36,09 \pm 0,09 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a v případě matolin bylo získáno  $10,91 \pm 0,11 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Druhá část této práce byla věnována produkci kyseliny mléčné. Nejprve byly provedeny kultivace vybraných producentů kyseliny mléčné na syntetickém médiu (MRS) obsahujícím různé druhy sacharidů (glukosa, xylosa, manosa, arabinosa, celobiosa, galaktosa, pektin a laktosa), které se mohou vyskytovat v odpadní biomase. Pro produkci kyseliny mléčné bylo vybráno 7 bakteriálních kmenů (*Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bacillus coagulans* CCM 2013, *Bacillus coagulans* CCM 2658, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757). Během těchto kultivací byla zkoumána především schopnost růstu a utilizace jednotlivých zdrojů uhlíku.

Bylo ověřeno, že vybrané bakteriální kmeny byly schopny růstu a utilizace všech testovaných jednoduchých sacharidů. Z výsledků však bylo také patrné, že utilizace některých sacharidů (xylosy a arabinosy) byla pro vybrané kmeny obtížnější. Po kultivacích na syntetických médiích následovaly kultivace vybraných kmenů na jednotlivých hydrolyzátech odpadních substrátů. Pro produkci kyseliny mléčné byl kromě hydrolyzáte kávové sedliny,

pomerančových slupek a matolin použit i hydrolyzát odpadního chleba. Byly provedeny kultivace za dvou podmínek, a to při pH 7 a na hydrolyzátu bez úpravy pH. Hodnoty pH u hydrolyzátů byly: kávová sedlina 4,30; matoliny 3,75; pomerančové slupky 4,05 a odpadní chléb 6,50. Vzhledem k hodnotě pH hydrolyzátu odpadního chleba byly provedeny pouze kultivace bez úpravy pH.

Bylo zjištěno, že hydrolyzáty vybrané odpadní biomasy jsou utilizovatelné mléčnými bakteriemi a převedeny na kyselinu mléčnou. Vyšších výtěžků bylo dosaženo v hydrolyzátech s upraveným pH. Bylo dosaženo poměrně dobrých výtěžností, ačkoliv hydrolyzáty nebyly obohaceny o další živiny. Tento fakt je velmi podstatný vzhledem k tomu, že bakterie mléčného kvašení jsou známy poměrně vysokými nároky na aminokyseliny, vitamíny a další komplexní živiny vyskytujícími se ve fermentačním médiu. Nejvyšších koncentrací kyseliny mléčné bylo skoro u všech hydrolyzátů dosaženo kmenem *L. rhamnosus* CCM 1825. Pouze v případě hydrolyzátu odpadního chleba bylo nejvyššího výtěžku dosaženo kmenem *B. coagulans* CCM 2658.

Porovnáním výtěžků kyseliny mléčné získaných kmenem *L. rhamnosus* na jednotlivých substrátech bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace a produktivity kyseliny mléčné bylo dosaženo na hydrolyzátu odpadního chleba ( $12,90 \pm 0,51 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Hlavním důvodem bude pravděpodobně to, že hydrolyzát odpadního chleba obsahuje především glukosu. Ostatní vybrané substráty obsahují vedle glukosy i další sacharidy (galaktosu, manosu, arabinosu či fruktosu). Hlavní výhodou hydrolyzátu odpadního chleba je i obsah minerálních látek a živin, které mohou mít pozitivní vliv na růst a produkci vybraných mikroorganismů. Nicméně vyšších výtěžnostních koeficientů bylo dosaženo v případě hydrolyzátu kávové sedliny a matolin. Ačkoliv tyto substráty obsahují látky, které mohou inhibovat růst bakterií mléčného kvašení, zdají se být také nadějnými pro produkci kyseliny mléčné.

Z důvodu optimalizace a zvýšení množství vyprodukované kyseliny mléčné byly provedeny také kultivace v bioreaktoru. Pro produkci kyseliny mléčné v bioreaktoru byl zvolen jako produkční kmen *L. rhamnosus* CCM 1825. Ten byl vybrán s ohledem na skutečnost, že na jednotlivých hydrolyzátech produkoval nejvyšší množství kyseliny mléčné, ale také z důvodu jeho schopnosti produkovat čistou L(+) formu kyseliny mléčné. Byly provedeny kultivace na hydrolyzátech pomerančových slupek, matolin, odpadního chleba a kávové sedliny, které byly obohaceny (kromě odpadního chleba) o  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  kvasničného extraktu. V případě hydrozátu odpadního chleba nebyl přídavek nutný vzhledem k jeho složení.

Více pozornosti bylo věnováno zkoumání utilizace hydrolyzátu kávové sedliny, kde bylo provedeno více experimentů v bioreaktorech. Byl fermentován jednak hydrolyzát bez suplementace kvasničným extraktem, poté hydrolyzát obohacen o  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  kvasničného extraktu

a syntetické médium s obsahem sacharidů podobným hydrolyzátu kávové sedliny, aby byl zjištěn efekt inhibitorů na použitý produkční kmen. Byly také provedeny kultivace v bioreaktoru i s pomocí dalších producentů (*B. coagulans* CCM 2658, *L. plantarum* CCM 7039).

Porovnáním výtěžků kyseliny mléčné získané kmenem *L. rhamnosus* na jednotlivých hydrolyzátech odpadní biomasy bylo zjištěno, že nejvyšší výtěžek a produktivita kyseliny mléčné byla získána fermentací hydrolyzátu odpadního chleba. Hlavním důvodem je především poměrně vysoký obsah fermentovatelných sacharidů ( $74,73 \pm 2,53 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  glukosy) v tomto hydrolyzátu. Nejvyššího výtěžnostního koeficientu ( $0,98 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) však bylo dosaženo v případě hydrolyzátu kávové sedliny. Nejnižší produktivita a koncentrace kyseliny mléčné byla dosažena fermentací hydrolyzátu matolin ( $5,69 \pm 0,66 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), což vychází především z nízkého obsahu fermentovatelných sacharidů ( $10,91 \pm 0,11 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v tomto substrátu.

Srovnáním produkce kyseliny mléčné na hydrolyzátu kávové sedliny se suplementací kvasničným extraktem a bez ní bylo dosaženo velmi podobných výtěžků. Lze tedy konstatovat, že suplementace kultivačního média kvasničným extraktem není nutná k dosažení vyššího množství kyseliny mléčné. V rámci celkového ekonomického vyhodnocení procesu by se tedy muselo zvážit, zda náklady vzniklé přidáním kvasničného extraktu mohou být kompenzovány zkrácením doby fermentace. Porovnáním s kultivací na syntetickém médiu s podobným sacharidickým složením jako hydrolyzát kávové sedliny lze usuzovat, že přítomnost inhibitorů v hydrolyzátu kávové sedliny nemá negativní vliv na výtěžnost kyseliny mléčné, jelikož dosažené koncentrace kyseliny mléčné a stejně tak i výtěžnostní koeficienty jsou srovnatelné. Nicméně lze předpokládat, že použitím vhodných detoxifikačních metod pro odstranění inhibičních látek z hydrolyzátu kávové sedliny, by se mohla zkrátit doba fermentace.

Třetí část této práce se zabývá možností produkce ethanolu na hydrolyzátech vybraných odpadů z potravinářských výrob. Nejprve byly provedeny kultivace 2 vybraných kmenů (*S. cerevisiae* CNCTC 6646 a *S. cerevisiae* CNCTC 6651) v Erlenmeyerových baňkách na jednotlivých hydrolyzátech. Následně byla provedena produkce ethanolu na hydrolyzátu kávové sedliny v bioreaktoru pomocí *S. cerevisiae* CNCTC 6646.

Kultivacemi v baňkách bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace ethanolu bylo dosaženo u kmene *S. cerevisiae* CNCTC 6646 na hydrolyzátu kávové sedliny ( $5,98 \pm 0,11 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Tento substrát a producent byli proto dále vybráni pro kultivace v bioreaktoru. Fermentací hydrolyzátu kávové sedliny v bioreaktoru bylo dosaženo výtěžku  $7,64 \pm 0,39 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ethanolu.

Závěrečná část předložené práce se věnuje zkoumání vlivu přidaného kyslíku na zvýšení produkce organických kyselin během acidogenní fáze anaerobní digesce. Nalezením vhodného režimu vzdušnění vytvářejícím mikroaerobní podmínky by mělo docházet

k navýšení produkce organických kyselin s krátkým řetězcem (především kyseliny octové) během acidogenní fáze anaerobní digesce. Bylo provedeno několik experimentů v modelovém bioreaktoru s různými režimy vzdušnění a různými procesy fermentace (vsádkové, přítokované a kontinuální).

Bylo zjištěno, že nejúčinnějším procesem byl přítokovaný způsob fermentace s režimem vzdušnění 30 s a 81 minut pauza, kdy bylo získáno  $4,36 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  organických kyselin, z toho  $2,21 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  tvořila kyselina octová. Vysoká výtěžnost tohoto procesu byla pravděpodobně způsobena dvojnásobnou koncentrací substrátu v médiu (2 hm. %). Během tohoto režimu vzdušnění bylo přidáno cca 30 ml kyslíku na 1 g biomasy, což lze pokládat za anaerobní podmínky.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ČR. 2001. Zákon o odpadech: č. 185/2001. In: Sbíрка zákonů.
- [2] *Směrnice Evropského Parlamentu A Rady (ES) č. 98/2008*. 2008. In: Štrasburk: Evropský parlament, 98.
- [3] Mirabella, Nadia, Valentina Castellani a Serenella Sala. 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.
- [4] Van Dyk, J.S., R. Gama, D. Morrison, S. Swart a B.I. Pletschke. 2013. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26, 521-531. ISSN 1364-0321
- [5] Girotto, F., Alibardi, L. & Cossu, R., 2015. Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste management*, 45, 32-41.
- [6] Alibardi, L., Muntoni, A., Polettini, A., 2014. Hydrogen and waste: illusions, challenges and perspectives. *Waste Management*, 34, 2425–2426.
- [7] Clarke, W.P., Alibardi, L., 2010. Anaerobic digestion for the treatment of solid organic waste: what's hot and what's not. *Waste Management*, 30, 1761–1762.
- [8] De Gioannis, G., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., 2013. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Management*, 33, 1345–1361.
- [9] Pham, T.P.T., Kaushik, R., Parshetti, G.K., Mahmood, R., Balasubramanian, R., 2015. Food-waste-to-energy conversion technologies: current status and future directions. *Waste Management*, 38, 399–408.
- [10] Hassan, M.A., Yee, L.N., Yee, P.L., Ariffin, H., Raha, A.R., Shirai, Y., Sudesh, K., 2013. Sustainable production of polyhydroxyalkanoates from renewable oil-palm biomass. *Biomass Bioenergy*, 50, 1–9.
- [11] Li, X., Chen, Y., Zhao, S., Chen, H., Zheng, X., Luo, J., Liu, Y., 2015. Efficient production of optically pure l-lactic acid from food waste at ambient temperature by regulating key enzyme activity. *Water Resources*, 70, 148–157.
- [12] Sulaiman, A., Othman, N., Baharuddin, A.S., Mokhtar, M.N., Tabatabaei, M., 2014. Enhancing the halal food industry by utilizing food wastes to produce value added bioproducts. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 121, 35.
- [13] Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y. & Sonomoto, K.. 2011. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 56(4), 286-301.



- [14] Abdel-Rahman, Mohamed Ali, Yukihiro Tashiro a Kenji Sonomoto. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31, 877-902.
- [15] Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A. & Mussatto, S.I. 2014. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Technology*, 7, 3493.
- [16] Mussatto, S.I., L.M. Carneiro, J.P.A. Silva, I. Roberto, J.A. Teixeira. 2011. A study on chemical constituents and sugar extraction from spent coffee grounds, *Carbohydrate Polymers*, 83. 368–374.
- [17] Murthy, P.S., Naidu, M.M. 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – a review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45–58.
- [18] Obruca, S., Benesova, P., Kucera, D., Petrik, S., Marova, I.. 2015. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*, 32 (6), 569-574, ISSN 1871-6784.
- [19] Silva, M. A., Nebra, S. A., Machado Silva, M. J., & Sanchez, C. G. 1998. The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. *Biomass and Bioenergy*, 14(5–6), 457–467.
- [20] Mussatto, S.I., Machado, E.M.S., Carneiro, L.M., Teixeira, J.A.. 2012. Sugar metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates, *Applied Energy*, 92, 763–768.
- [21] Al-Hamamre, Z., S. Foerster, F. Hartmann, M. Kroger, M. Kaltschmitt. 2012. Oil extracted from spent coffee ground as a renewable source for fatty acid methylester manufacturing, *Fuel*, 96, 70–76.
- [22] Kwon, E.E., H. Yi, Y.J. Jeon. 2013. Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds, *Bioresource Technology*, 136, 475–480.
- [23] Obruca S, Benesova P, Petrik S, Oborna J, Prikryl R, Marova I. 2014. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry*, 49, 1409–1414.
- [24] Machado, E.M.S., R.M. Rodriguez-Jasso, J.A. Teixeira, S.I. Mussatto. 2012. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds, *Biochemical Engineering Journal*, 60, 87–90.
- [25] Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M.A., Pellerin, P. 2001. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45, 315-323.



- [26] Botella, C., Diaz, A., de Ory, I., Webb, C., Blandino, A. 2007. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 42 (1), 98-101.
- [27] Bertran, E., Sort, X., Soliva, M., Trillas, I. 2004. Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresource Technology*, 95 (2), 203-208.
- [28] Botella, C., de Ory, I., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, 26 (2), 100-106.
- [29] Pourbafrani, M. et al., 2010. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology*, 101(11), 4246-4250.
- [30] Sharma, K. et al., 2017. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. *Nutrition*, 34, pp.29-46.
- [31] Ruiz, B. & Flotats, X., 2016. Effect of limonene on batch anaerobic digestion of citrus peel waste. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 9-18.
- [32] Mantzouridou, F.T., Paraskevopoulou, A. & Lalou, S., 2015. Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 1-8.
- [33] Lohrasbi, M. et al., 2010. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. *Bioresource Technology*, 101(19), 7382-7388.
- [34] Kawa-Rygielska, J., Pietrzak, W. & Czubaszek, A. 2012. Characterization of fermentation of waste wheat-rye bread mashes with the addition of complex enzymatic preparations. *Biomass and Bioenergy*, 44, 17-22.
- [35] Pietrzak, Witold A Joanna Kawa-Rygielska. 2014. Ethanol fermentation of waste bread using granular starch hydrolyzing enzyme: Effect of raw material pretreatment. *Fuel*, 134, 250-256. ISSN 00162361.
- [36] Ebrahimi, F., Morteza Khanahmadi, Shapoor Roodpeyma A Mohammad J. Taherzadeh. 2008. Ethanol production from bread residues. *Biomass and Bioenergy*, 32 (4), 333-337. ISSN 09619534.
- [37] Young-Jung, Wee, Jin-Nam Kim a Hwa-Won Ryu. 2006. Biotechnological Production of Lactic Acid. *Food technology and biotechnology*, 44 (2). ISSN 1330-9862.
- [38] John, K.M., Nampoothiri, A. Pandey. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 524-534

- [39] Gao, C., Ma, C. & Xu, P., 2011. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*, 29(6), 930-933.
- [40] Zhang, Zhan Ying, Bo Jin a Joan M. Kelly. 2007. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 35 (3), 251-263.
- [41] Castillo Martinez, F., Balciunas, E., Salgado, J., Domínguez González, J., Converti, A. & Oliveira, R. 2013. Lactic acid properties, applications and production. *Trends in Food Science*, 30 (1), 70-83.
- [42] Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A.. 2010. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 413-423.
- [43] Datta R, Henry M. 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies - a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*; 81,1119 – 1129.
- [44] Srivastava, A., Narayanan, N. & Roychoudhury, P.. 2004. L (-) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7 (2), 167-179.
- [45] Hábová, V., Melzoch, K., Rychtera, M. 2004. Modern Method of Lactic Acid Recovery. *Czech Journal of Food Science*, 22 (3), 87-94.
- [46] Ghaffar, T. et Al., 2014. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 222-229. ISSN 1687-8507.
- [47] Wang, Y., Tashiro, Y. & Sonomoto, K., 2015. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (1), 10–18.
- [48] Mozzi, F. 2016 Lactic Acid Bacteria, In *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford, 501-508, ISBN 9780123849533.
- [49] Pedersen, Martin B., Philippe Gaudu, Delphine Lechardeur, Marie-Agnès Petit A Alexandra Gruss. 2012. Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual review Food science and technology*. 3, 37-58.
- [50] Serna Cock, L. & Rodriguez De Stouvenel, A. 2006. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9 (1), 40-45
- [51] Bai, D., Li, S., Liu, Z. & Cui, Z. 2007. Enhanced L - Lactic Acid Production by an Adapted Strain of *Rhizopus oryzae* using Corncob Hydrolysate. *Applied Biochemistry*

- and *Biotechnology*, 144 (1), 79-85.
- [52] Maneeboon T, Vanichsriratana, W., Pomchaitaward C, Kitpreechavanich V. 2010. Optimization of lactic acid production by pellet-form *Rhizopus Oryzae* in 3-L airlift bioreactor using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, 137-146
  - [53] Tokuhiko K, Ishida N, Kondo A, Takahashi H. 2008. Lactic fermentation of cellobiose by a yeast strain displaying  $\beta$ -glucosidase on the cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79, 481-8.
  - [54] Hofvendahl, K. & Hahn-Hägerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), 87-107.
  - [55] Ding, S. a Tan, T. 2006. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, 41 (6), 1451-1454.
  - [56] Valentina Siracusa and Carlo Ingraio. 2016. The Use of Polylactic Acid in Food Packaging, In: *Reference Module in Food Science*, Elsevier, ISBN 978-0-0810-0596-5
  - [57] Alves De Oliveira, Regiane, Andrea Komesu, Carlos Eduardo Vaz Rossell a Rubens Maciel Filho, 2018. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal*. 133, 219-239.
  - [58] Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y. a Tan, T. 2015. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*, 47, 60-88.
  - [59] Hromádka, J., Hromádka, J., P. Miler, V. Hönig, a P. Štěrbá. 2011. Využití bioethanolu jako paliva ve spalovacích motorech. *Chemické listy*, 105(2), 122-128.
  - [60] Balat, M., Balat, H. a Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551-573.
  - [61] Rychtera, M., Uher, J. a Páca, J. 1991. *Lihovarství, droždářství a vinařství*, Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.
  - [62] Vodrážka, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opravené vydání. Praha: Academia, 2002. 508. ISBN 978-80-200-0600-4.
  - [63] Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858-875.
  - [64] Hromádka, Jan, Jiří Hromádka, Petr Miller, Vladimír Hönig a Pavel Štěrbá. 2010. Výroba bioetanolu. *Listy lihovarnické a řepářské*, 126.
  - [65] Botheju, D. and Bakke, R., 2011. Oxygen Effects in Anaerobic Digestion – A Review. *The Open Waste Management Journal*, 4, 1-19.

- [66] EBA, 2014. Biogas Production in Europe: Biogas Report 2014.
- [67] Sawatdeenarunat, Chayanon, Shihwu Sung a Samir Kumar Khanal. 2017. Enhanced volatile fatty acids production during anaerobic digestion of lignocellulosic biomass via micro-oxygenation. *Bioresource Technology*, **237**, 139-145.
- [68] Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T., 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends Biotechnology*, 29, 70–78.
- [69] Yu, J., 2001. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*, 86, 105–112.
- [70] Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Ngoh, G.C., 2014. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 235, 83–99.
- [71] Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., Larroche, C., 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 114, 443–449.
- [72] Chae, K.J., Choi, M.J., Kim, K.Y., Ajayi, F.F., Chang, I.S., Kim, I.S., 2010. Selective inhibition of methanogens for the improvement of biohydrogen production in microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrogen Energy*, 35, 13379–13386.
- [73] Khanal, S.K., Chen, W.-H., Li, L., Sung, S., 2006. Biohydrogen production in continuous-flow reactor using mixed microbial culture. *Water Environment research*, 78, 110–117.
- [74] Zhu, H., Béland, M., 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 1980–1988.
- [75] Lim, J.W., Wang, J.Y., 2013. Enhanced hydrolysis and methane yield by applying microaeration pretreatment to the anaerobic co-digestion of brown water and food waste. *Waste Management*, 33, 813–819.
- [76] Zhu, M., Lü, F., Hao, L.-P., He, P.-J., Shao, L.-M., 2009. Regulating the hydrolysis of organic wastes by micro-aeration and effluent recirculation. *Waste Management*, 29, 2042–2050.
- [77] Nielsen, S. 2010. Food analysis. 4. vyd. New york: Springer. ISBN 978-1-4418-1477-4.
- [78] Wrolstad, Ronald E. 2000. Handbook of food analytical chemistry. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience. ISBN 04-717-2187-5.

- [79] Káš, Jan, Milan Kodíček A Olga Valentová. 2005. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 258. ISBN 80-708-0586-2.
- [80] Tissue, B. 2000. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). In: Chemistry Hypermedia Project. Dostupné z: <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/sep/lc/hplc.html>
- [81] HPLC - High Performance Liquid Chromatography. WATERS. What Is HPLC (High Performance Liquid Chromatography). 2012. Dostupné z: [http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=en\\_CZ](http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=en_CZ)
- [82] Lee, J, Durst, R.W. a Wrolstad, R. E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 88(5), 1269–1278.
- [83] Lee, J., Rennaker, Ch. a Wrolstad, R. E. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 110(3), 782-786. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.010.
- [84] Bajčan, D, Harangozo, L., Hrabovská, D. A Bončíková, D. 2013. Optimizing Conditions For Spectrophotometric Determination Of Total Polyphenols in wines using Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2(1), 1699-1708
- [85] Amendola, D., De Faveri, D.M. A Spigno, G. 2010. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering*. 97(3), 384-392. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2009.10.033.
- [86] Zhang, H.B. et al. 2016. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*. 204, 70-76. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.094.
- [87] Nordmann, W. 1977. Die Überwachung der Schlammfaulung. KA-Informationen für das Betriebspersonal, Beilage zur Korrespondenz Abwasser.
- [88] McGhee T. J., 1968, A Method For Approximation of the Volatile Acid Concentrations in Anaerobic Digesters, *Water and Sewage Works*, 115, 162-166.
- [89] Voß E., Weichgrebe D., Rosenwinkel, K. H., 2009. FOS/TAC-Deduction, Methods, Application and Significance, Internationale Wissenschaftskonferenz „Biogas Science 2009 – science meets practice“, LfL-Bayern, 2-4. 12.09, Erding.
- [90] Singleton, V. L. a J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16(3), 144-158.

- [91] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. a Crocker, D. 2012. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618.
- [92] Petrik, S., Obruča, S., Benešová, P., Márová, I., 2014. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochemical Engineering Journal*. 90, 307-315.
- [93] Ballesteros, Lina F., José A. Teixeira a Solange I. Mussatto, 2014. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Technology*. 7, 3493–3503.
- [94] Hervert-Hernández, Deisy, Concepción Pintado, Rafael Rotger a Isabel Goñi, 2009. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *International Journal of Food Microbiology*. 136(1), 119-122.
- [95] García-Ruiz, Almudena, M. Victoria Moreno-Arribas, Pedro J. Martín-Álvarez a Begoña Bartolomé, 2011. Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 145(2-3), 426-431.
- [96] Corbin, Kendall R., Yves S.Y. Hsieh, Natalie S. Betts, et al., 2015. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource Technology*. 193, 76–83.
- [97] Gabriela Rapeanu, Gabriela Bahrim, Nicoleta Stanciuc, 2014. Chapter 38 - Microorganism Metabolic Activity Stimulation by Polyphenols, Editor(s): Ronald Ross Watson, Victor R. Preedy, Sherma Zibadi, Polyphenols in Human Health and Disease, Academic Press, 513-521, ISBN 9780123984562.
- [98] Pedras, Bruno, Madalena Salema-Oom, Isabel Sá-Nogueira, Pedro Simões, Alexandre Paiva a Susana Barreiros, 2017. Valorization of white wine grape pomace through application of subcritical water: Analysis of extraction, hydrolysis, and biological activity of the extracts obtained. *The Journal of Supercritical Fluids*. 128, 138-144.
- [99] Mamma, Diomi, Elisavet Kourtoglou a Paul Christakopoulos, 2008. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*. 99(7), 2373–2383.
- [100] Rezzadori, K., S. Benedetti a E.R. Amante, 2012. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food and Bioprocess Processing*. 90(4), 606–614.
- [101] Oberoi, Harinder Singh, Praveen Venkata Vadlani, Ronald L. Madl, Lavudi Saida a Jithma P. Abeykoon, 2010. Ethanol Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(6), 3422–3429.



- [102] Chiaramonti, David, Matteo Prussi, Simone Ferrero, Luis Oriani, Piero Ottonello, Paolo Torre a Francesco Cherchi, 2012. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*. 46, 25-35.
- [103] Kumari, Dolly a Radhika Singh, 2018. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 90, 877-891.
- [104] Seidl, Peter R. a Adriana K. Goulart, 2016. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2, 48-53.
- [105] Taherzadeh, Mohammad a Keikhosro Karimi, 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 9(9), 1621-1651.
- [106] Viscozyme L, 2018. *Sigma Aldrich* [online]. Darmstadt, Germany: Merck [cit. 2018-07-31]. Dostupné z: [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/v2010?lang=en&ion=CZ](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/v2010?lang=en&ion=CZ)
- [107] Hassan, Shady S., Gwilym A. Williams a Amit K. Jaiswal, 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 262, 310-318.
- [108] Zhang, Zhenting, Yuejiao Xie, Xiaolan He, et al., 2016. Comparison of high-titer lactic acid fermentation from NaOH- and NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-pretreated corncob by *Bacillus coagulans* using simultaneous saccharification and fermentation. *Scientific reports*. 6, 37245.
- [109] Jönsson, Leif J. a Carlos Martín, 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 199, 103-112. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.009. ISBN 0960-8524.
- [110] Ma, K. et al. 2014. Open fermentative production of l-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excess sludge as nutrient. *Bioresource Technology*. 151, 28-35.
- [111] Büyükkileci, A. O., & Harsa, S. 2004. Batch production of L (+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Chemical Technology*. 79(9), 1036-1040.
- [112] Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N., Bunko, K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105(1), 1-14.
- [113] Rosario Muñoz, M. Victoria Moreno-Arribas, Blanca de las Rivas, 2011. Chapter 8 - Lactic Acid Bacteria, Editoři: Alfonso V. Carrascosa, Rosario Muñoz, Ramón González, Molecular Wine Microbiology, Academic Press, 191-226, ISBN 9780123750211

- [114] Wang, Y., Li, Y., Pei, X., Yu, L, Feng, Y., 2007. Genome-shuffling improved acid tolerance and l-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Biotechnology*. 129(3), 510-515.
- [115] Yadav, A.K., Chaudhari, A.B., Kothari, R.M. 2011. Bioconversion of renewable resources into lactic acid: An industrial view. *Crit Rev Biotechnol*. 31, 1-19.
- [116] Cotter, P. D. a C. Hill, 2013. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(3), 429-453.
- [117] Benabda, Olfa, Mariam Kasmi, Faten Kachouri a Moktar Hamdi, 2018. Valorization of the powdered bread waste hydrolysate as growth medium for baker yeast. *Food and Bioproducts Processing*. 109, 1-8.
- [118] Hedberg, M. et al., 2008. Sugar fermentation in probiotic bacteria - an in vitro study. *Oral Microbiology and Immunology*. 23, 482–485.
- [119] Iyer, P.V., Thomas, S. and Lee, Y.Y., 2000. High-Yield Fermentation of Pentoses into Lactic Acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84, 665–677.
- [120] Marques, S., Santos, J.A.L., Girio, F.M., Roseiro, J.C., 2008. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 41, 210–6.
- [121] Gullon, B., Yanez, R., Alonso, J.L., Parajo, J.C., 2008. L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* 99, 308–19.
- [122] Romani, A., Yanez, R., Garrote, G., Alonso, J.L., 2008. SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges. *Bioresource Technology* 99, 4247–54.
- [123] Karmee, S. K., 2018. A spent coffee grounds based biorefinery for the production of biofuels, biopolymers, antioxidants and biocomposites. *Waste Management*. 72, 240-254.
- [124] Mata, M.T., Martins A. A., Caetano S. N., 2018. Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization, *Bioresource Technology*, 247, 1077-1084.
- [125] Eş, Ismail, Amin Mousavi Khaneghah, Francisco J. Barba, Jorge A. Saraiva, Anderson S. Sant'ana a Seyed Mohammad Bagher Hashemi, 2018. Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Research International*. 107, 763-770.
- [126] Mohd Azhar, Siti Hajar, Rahmath Abdulla, Siti Azmah Jambo, Hartinie Marbawi, Jualang Azlan Gansau, Ainol Azifa Mohd Faik A Kenneth Francis Rodrigues, 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 10, 52-61.
- [127] Cheng, N.G., Hasan, M. a Kumoro, A.C., 2009. Production of ethanol by fed-batch fermentation. *Pertanika Journal of Science and Technology*, 17, 399-408.



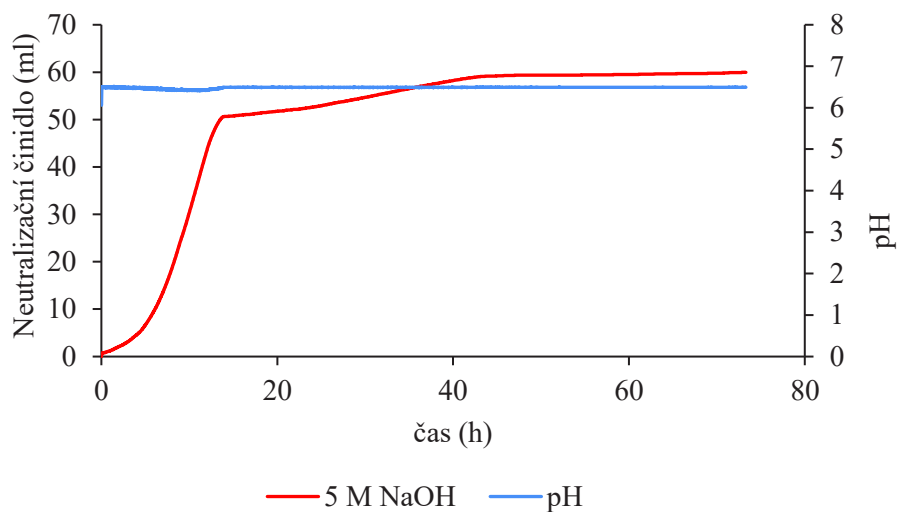
- [128] Sánchez, Óscar J. A Carlos A. Cardona, 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99, 5270–5295.
- [129] Pirt, S. J., Lee, Y. K., 1983. Enhancement of methanogenesis by traces of oxygen in bacterial digestion of biomass. *FEMS Microbiology Letters*. 18, 61-63.
- [130] Gerritse, J., Schut, F., Gottschal, J. C., 1990. Mixed chemostat cultures of obligately aerobic and fermentative or methanogenic bacteria grown under oxygen-limiting conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 66, 87-94.
- [131] Fu, Shan-Fei, Shuai He, Xiao-Shuang Shi, Naveen Reddy Katukuri, Meng Dai a Rong-Bo Guo, 2015. The chemical properties and microbial community characterization of the thermophilic microaerobic pretreatment process. *Bioresource Technology*. 198, 497-502.
- [132] Charles, W., Walker, L., Cord-Ruwisch, R., 2009. Effect of pre-aeration and inoculum on the start-up of batch thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste. *Bioresource Technology*. 100, 2329–2335.
- [133] Lupitsky, Robert, Dania Alvarez-Fonseca, Zachary D. Herde a Jagannadh Satyavolu, 2018. In-situ prevention of hydrogen sulfide formation during anaerobic digestion using zinc oxide nanowires. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 6(1), 110-118.
- [134] Yan, Li, Jie Ye, Panyue Zhang, et al., 2018. Hydrogen sulfide formation control and microbial competition in batch anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater sludge: Effect of initial sludge pH. *Bioresource Technology*. 259, 67-74.

## SEZNAM ZKRATEK

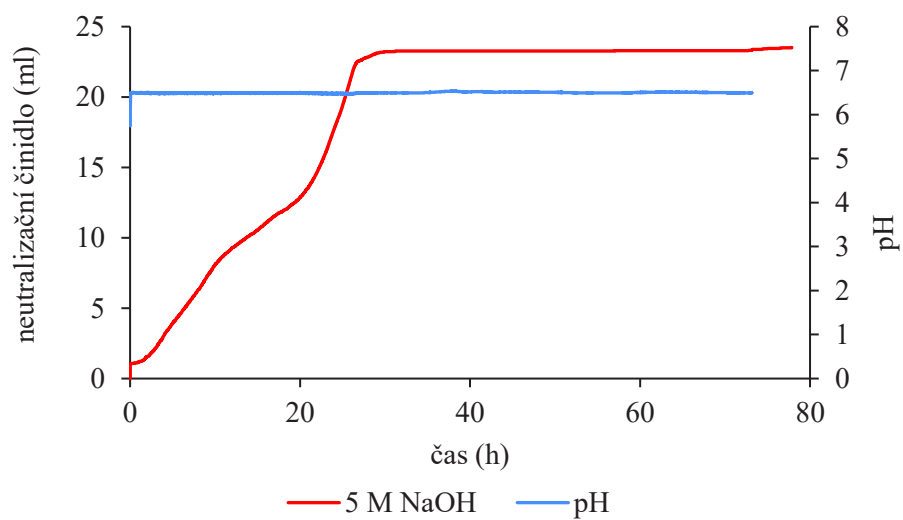
D- .....	pravotočivá forma optického izomeru
L- .....	levotočivá forma optického izomeru
DL- .....	racemická směs optických izomerů
H <sup>+</sup> .....	vodíkový kation
NAD .....	nikotinamidadenindinukleotid
LDH.....	laktátdehydrogenasa
PKP.....	fosfoketolasová dráha
GAP .....	glyceraldehyd-3-fosfát
P .....	fosfát
ATP.....	adenosintrifosfát
LdhA .....	NAD <sup>+</sup> -dependentní laktátdehydrogenasa A
LdhB .....	NAD <sup>+</sup> -dependentní laktátdehydrogenasa B
BMK .....	bakterie mléčného kvašení
CO <sub>2</sub> .....	oxid uhličitý
PLA.....	polylactic acid (kyselina polymléčná)
K .....	Kelvin
MPa.....	megaPascal
EMP .....	Embden-Meyerhofova dráha
AD .....	anaerobní digesce („Anaerobic Digestion“)
OD .....	optická hustota („optical density“)
HPLC.....	vysoce účinná kapalinová chromatografie („High Performance Liquid Chromatography“)
FOS .....	obsah organických kyselin („Flüchtige Organische Säuren“)
TAC .....	celkový anorganický uhlík („Totales Anorganisches Carbonat“)
Lbc., L. ....	<i>Lactobacillus</i>
B. ....	<i>Bacillus</i>
RID .....	refraktometrický detektor („Refractive index detector“)
DAD .....	detektor diodového pole („Diode array detector“)

## Přílohy

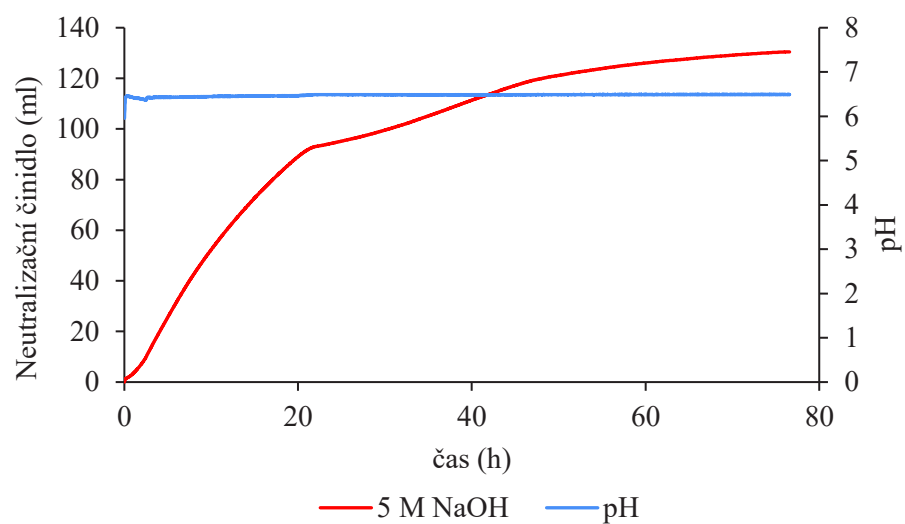
### Příloha I: pH profily a přídavky neutralizačních činidel během produkce kyseliny mléčné v bioreaktoru



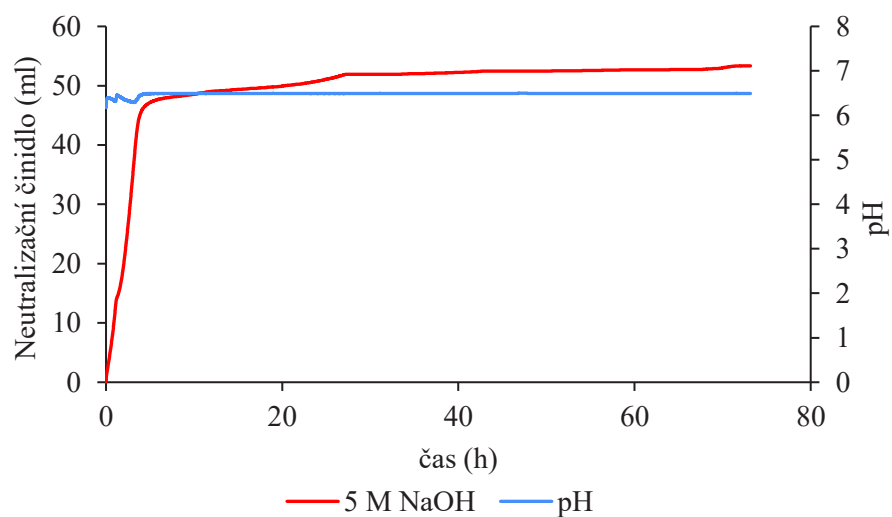
*Příloha I - graf 1: pH profil fermentace hydrolyzátu pomerančových slupek v bioreaktoru*



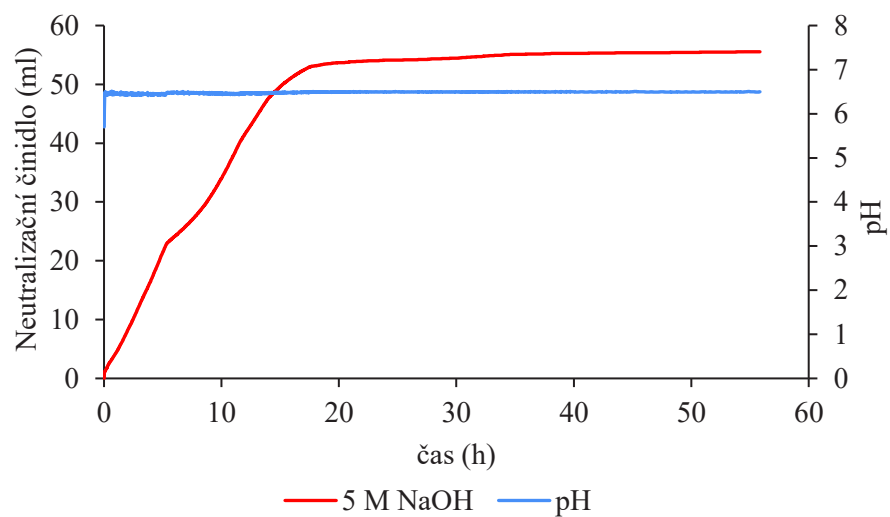
*Příloha I - graf 2: pH profil fermentace hydrolyzátu matolin v bioreaktoru*



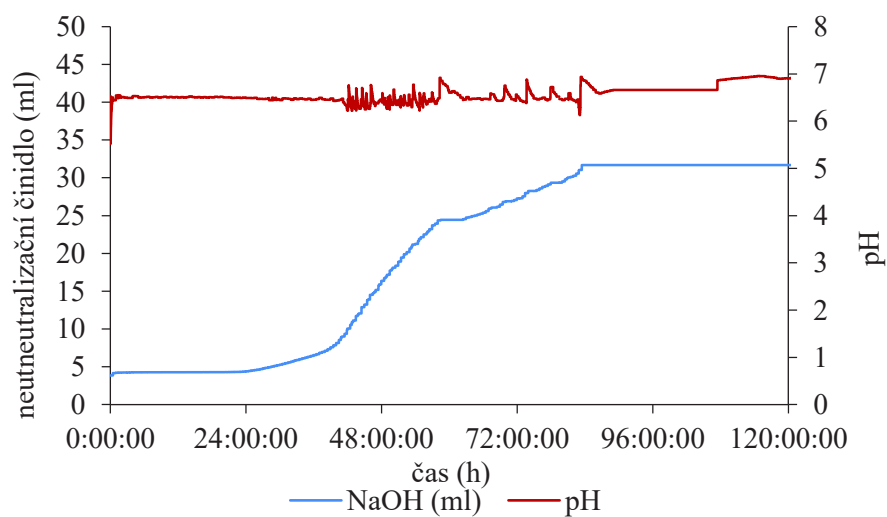
*Příloha I - graf 3: pH profil fermentace hydrolyzátu odpadního pečiva v bioreaktoru*



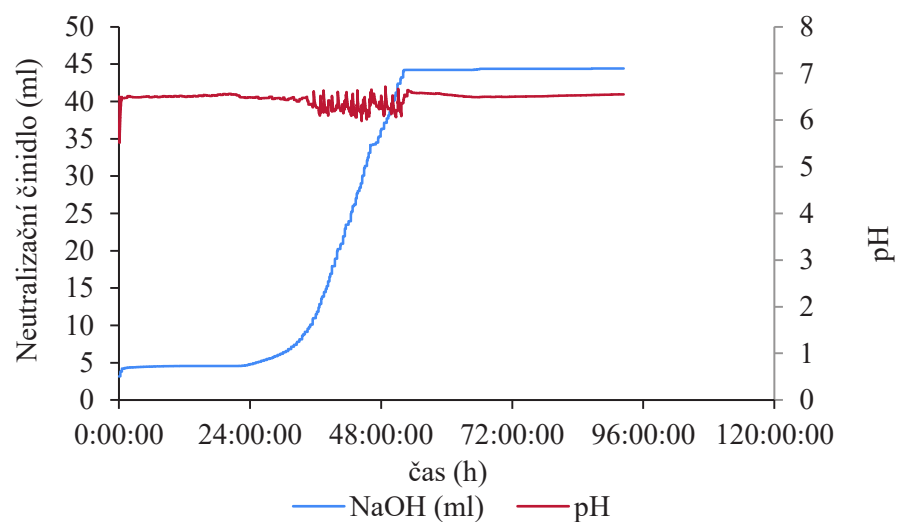
*Příloha I - graf 4: pH profil fermentace hydrolyzátu kávové sedliny pomocí *B. coagulans* v bioreaktoru*



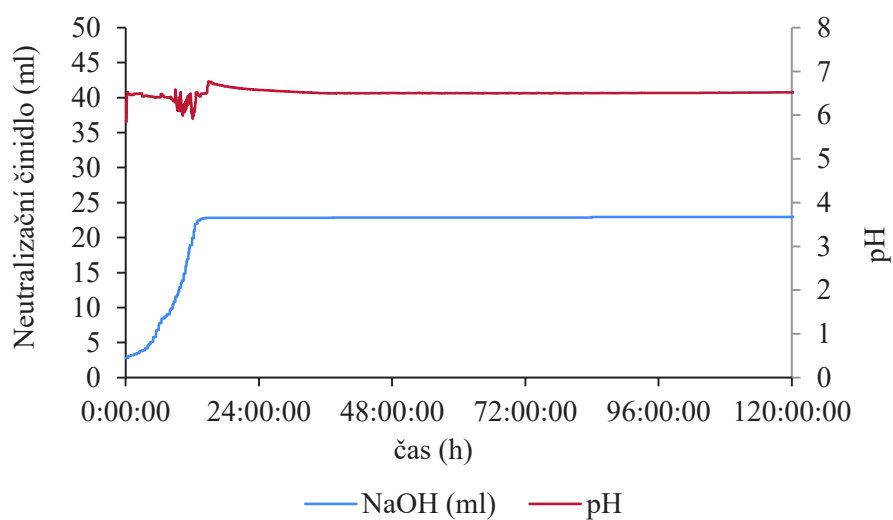
Příloha I - graf 5: pH profil fermentace hydrolyzátu kávové sedliny pomocí *Lbc. plantarum* v bioreaktoru



Příloha I - graf 6: pH profil fermentace hydrolyzátu kávové sedliny pomocí *L. rhamnosus* v bioreaktoru



*Příloha I - graf 7: pH profil fermentace hydrolyzátu kávové sedliny s přidavkem kvasničného extraktu pomocí *L. rhamnosus* v bioreaktoru*



*Příloha I - graf 8: pH profil fermentace syntetického média s přidavkem kvasničného extraktu pomocí *L. rhamnosus* v bioreaktoru*

## Příloha II: Mikroaerobní předúpravy

### Vsádkové (batch) fermentace

*Příloha II - tabulka 1: množství organických kyseliny v průběhu fermentace batch 1*

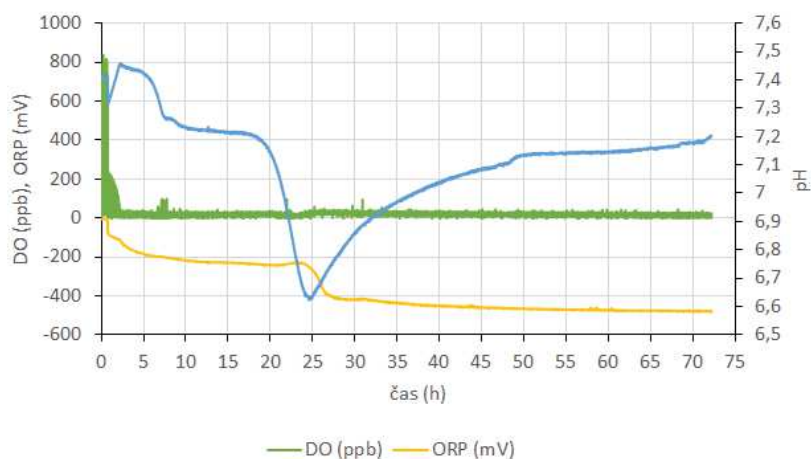
čas (h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
0	-	-	-	-	-	-
5	-	-	0,04	-	-	-
24	0,03	0,07	0,66	0,20	0,22	-
48	-	-	0,97	0,27	0,11	0,02
72	0,00	-	1,19	0,27	0,11	0,02

*Příloha II - tabulka 2: množství vznikajících plynů nad médiem v průběhu fermentace batch 1*

substance/čas (h)	0	5	24	48	72
CH <sub>4</sub> (obj. %)	0,1	0	0	0	0
CO <sub>2</sub> (obj. %)	10,6	8,4	39	11,4	8,8
O <sub>2</sub> (obj. %)	11,6	11,9	0	9,8	10,1
H <sub>2</sub> S (ppm)	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> (obj. %)	0	0,02	4	0	0

*Příloha II - tabulka 3: hodnoty FOS a TAC v průběhu fermentace batch 1*

čas (h)	TAC (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS/TAC
0	2105	259	0,123
5	2309	380	0,165
24	1751	1307	0,746
48	1720	1473	0,856
72	1655	1479	0,894



Příloha II - graf 1: Časový průběh pH, DO a ORP v bioreaktoru během fermentace batch 1

Příloha II - tabulka 4: množství organických kyseliny v průběhu fermentace batch 2

čas (h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
0	-	-	0,01	-	-	-
24	-	-	0,98	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-

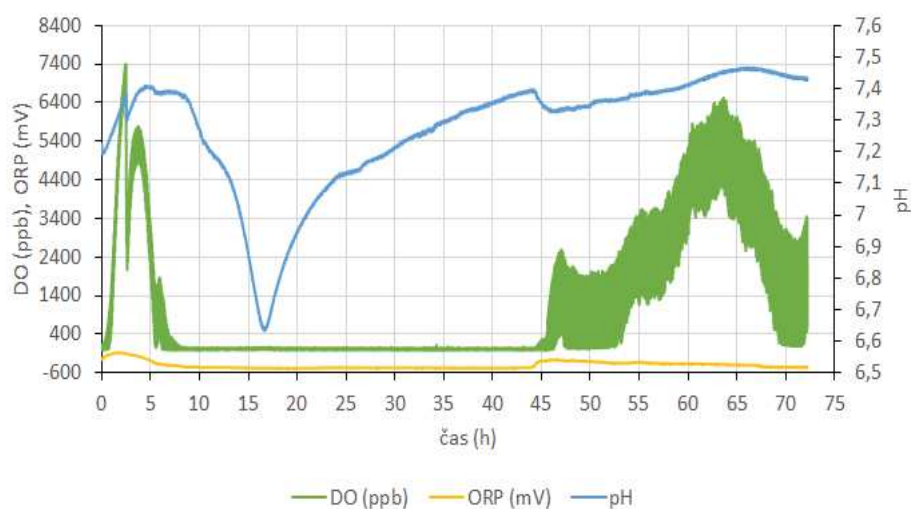
Příloha II - tabulka 5: množství vznikajících plynů nad médiem v průběhu fermentace batch 2

substance/čas (h)	0	24	48	72
CH <sub>4</sub> (obj. %)	0,7	0	0	0
CO <sub>2</sub> (obj. %)	10,8	12,2	10,4	8,2
O <sub>2</sub> (obj. %)	14,6	7,5	8,6	10,8
H <sub>2</sub> S (ppm)	0	0	0	0
H <sub>2</sub> (obj. %)	0	0	0	0

Příloha II - tabulka 6: hodnoty FOS a TAC v průběhu fermentace batch 2

čas (h)	TAC (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS/TAC
0	2095	304	0,117
24	1756	1173	0,668
48	2163	276	0,128
72	2339	310	0,133





*Příloha II - graf 2: Časový průběh pH, DO a ORP v bioreaktoru během fermentace batch 2*

*Příloha II - tabulka 7: množství organických kyseliny v průběhu fermentace batch 3*

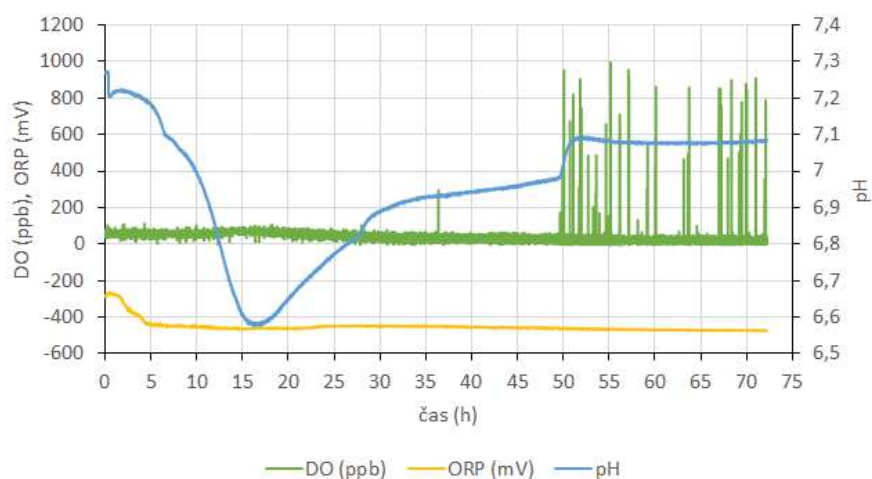
čas(h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
0	-	-	0,04	-	-	-
24	-	0,08	1,08	0,49	0,13	-
48	-	-	1,36	0,59	0,12	-
72	-	-	1,49	0,59	0,08	-
96	-	-	1,63	0,58	0,03	-

*Příloha II - tabulka 8: množství vznikajících plynů nad médiem v průběhu fermentace batch 3*

substance/čas (h)	0	24	48	72	96
CH <sub>4</sub> (obj. %)	4	0,5	0,4	0,4	0,5
CO <sub>2</sub> (obj. %)	15,5	25	15	11,6	12,4
O <sub>2</sub> (obj. %)	15,3	8,9	10,7	8,1	7,7
H <sub>2</sub> S (ppm)	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> (obj. %)	0	0	0	0	0

Příloha II - tabulka 9: hodnoty FOS a TAC v průběhu fermentace batch 3

čas (h)	TAC (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS/TAC
0	2687	365	0,136
24	1987	1865	0,939
48	2024	2201	1,087
72	2022	2303	1,139
96	2089	2400	1,149



Příloha II - graf 3: Časový průběh pH, DO a ORP v bioreaktoru během fermentace batch 3

Příloha II - tabulka 10: množství organických kyseliny v průběhu fermentace batch 4

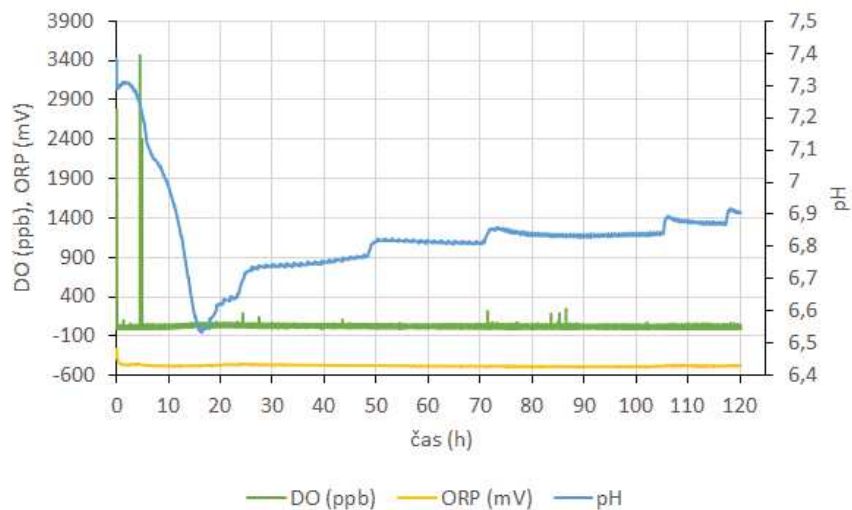
čas (h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
0	-	-	0,03	-	-	-
24	-	-	1,01	0,58	0,19	-
48	-	-	1,35	0,75	0,24	0,04
72	-	-	1,59	0,83	0,25	0,05
120	-	-	2,03	0,98	0,25	0,05
144	-	-	2,15	0,99	0,23	0,05

*Příloha II - tabulka 11: množství vznikajících plynů nad médiem v průběhu fermentace batch 4*

substance/čas (h)	0	24	48	72	120	144
CH <sub>4</sub> (obj. %)	1,7	4,8	4	2,4	1,8	1,8
CO <sub>2</sub> (obj. %)	10	4	31	26	21	18,5
O <sub>2</sub> (obj. %)	14,3	10,6	9,5	10	9,6	9,2
H <sub>2</sub> S (ppm)	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> (obj. %)	0	0	0	0	0	0

*Příloha II - tabulka 12: hodnoty FOS a TAC v průběhu fermentace batch 4*

čas(h)	TAC (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS/TAC
0	2543	353	0,139
24	2293	1944	0,848
48	2210	2423	1,096
72	2104	2646	1,246
120	2162	3331	1,541
144	2125	3470	1,633



*Příloha II - graf 4: Časový průběh pH, DO a ORP v bioreaktoru během fermentace batch 4*

### Přítokované (fed-batch) fermentace

Příloha II - tabulka 13: množství organických kyseliny v průběhu fermentace fed-batch 5

čas (h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
0	-	-	-	-	-	-
13	-	-	0,22	-	-	-
15	-	-	0,28	-	-	-
17	-	-	0,351	-	-	-
21	0,09	-	0,49	0,05	0,11	-
24	0,01	-	0,51	0,04	0,11	-
44	-	-	-	-	0,10	-
62	-	-	-	-	0,11	-
65	-	-	-	-	0,12	-
67	0,07	-	0,09	-	0,11	-
70	-	-	0,18	-	0,12	-
88	-	-	0,27	-	0,12	-
110	-	-	-	-	0,12	-
134	-	-	-	-	0,12	-
163	-	-	-	-	0,12	-
182	-	-	-	-	0,12	-
189	-	-	-	-	0,1	-
206	-	-	-	-	0,12	-

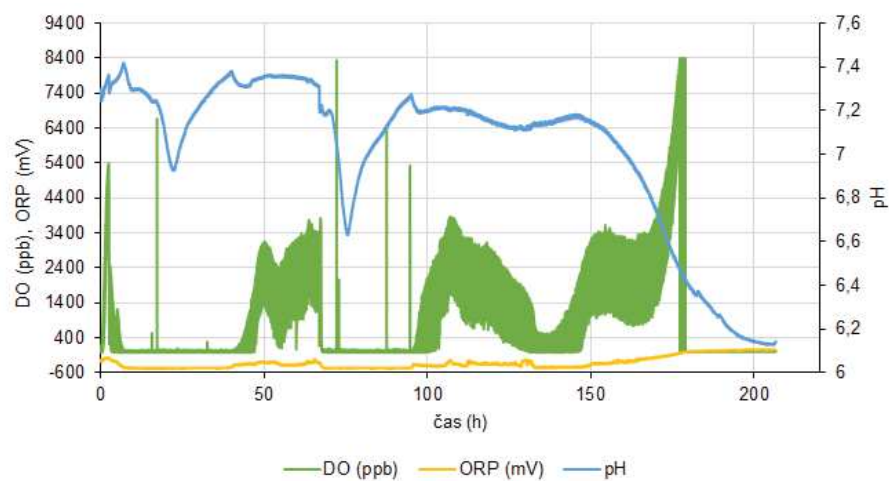
Příloha II - tabulka 14: množství vznikajících plynů nad médiem v průběhu fermentace fed-batch 5

substance/čas (h)	0	13	15	17	21	24	44	62	*65
CH <sub>4</sub> (obj. %)	0,8	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0
CO <sub>2</sub> (obj. %)	14,5	16	8	17,5	23	18	13,5	15,5	17,5
O <sub>2</sub> (obj. %)	13	8,2	15,9	8,5	8,4	7	6,8	12,5	9,6
H <sub>2</sub> S (ppm)	4	8	8	9	7	8	14	20	24
substance/čas (h)	67	70	88	110	134	163	182	189	206
CH <sub>4</sub> (obj. %)	0,1			0	0		0	0	0
CO <sub>2</sub> (obj. %)	15	pěna	pěna	12,2	13,5	pěna	12,2	9,2	6,2
O <sub>2</sub> (obj. %)	9,7			10,2	6,2		14,7	16	17,3
H <sub>2</sub> S (ppm)	23			10	18		55	63	77

\*přídavek substrátu

Příloha II - tabulka 15: hodnoty FOS a TAC v průběhu fermentace fed-batch 5

čas (h)	TAC (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS/TAC
0	2410	301	0,125
13	2314	514	0,222
15	2142	537	0,251
17	2144	643	0,300
21	1821	847	0,465
24	1915	872	0,455
44	2113	270	0,128
62	1944	267	0,137
*65	1882	265	0,141
67	1932	424	0,219
70	1887	513	0,273
88	1536	526	0,342
110	1556	243	0,156
134	1455	223	0,153
163	951	216	0,227
182	208	166	0,798
189	135	151	1,119
206	82	135	1,646



Příloha II - graf 5: Časový průběh pH, DO a ORP v bioreaktoru během fermentace fed-batch 5

*Příloha II - tabulka 16: množství organických kyseliny v průběhu fermentace fed-batch 6*

čas (h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
0	-	-	0,02	-	0,11	-
14	0,01	0,26	0,6	0,23	0,11	-
16	0,16	0,23	0,66	0,33	0,11	-
20	-	0,14	0,72	0,46	0,12	-
24	-	0,08	0,76	0,49	0,13	-
39	-	-	0,97	0,72	0,17	0,02
45	-	-	1,03	0,75	0,18	0,03
62	-	-	1,14	0,8	0,19	0,04
66	-	-	1,16	0,81	0,19	0,04
68	0,01	-	1,2	0,84	0,2	0,04
71	-	-	1,28	0,93	0,22	0,04
87	-	-	1,68	1,35	0,43	0,08
113	-	-	1,83	1,45	0,46	0,02
141	-	-	1,94	1,52	0,49	0,04
164	-	-	2,01	1,55	0,5	0,05
188	-	-	2,09	1,58	0,51	0,05
213	-	-	2,21	1,59	0,5	0,06
235	-	-	2,15	1,61	0,5	0,06

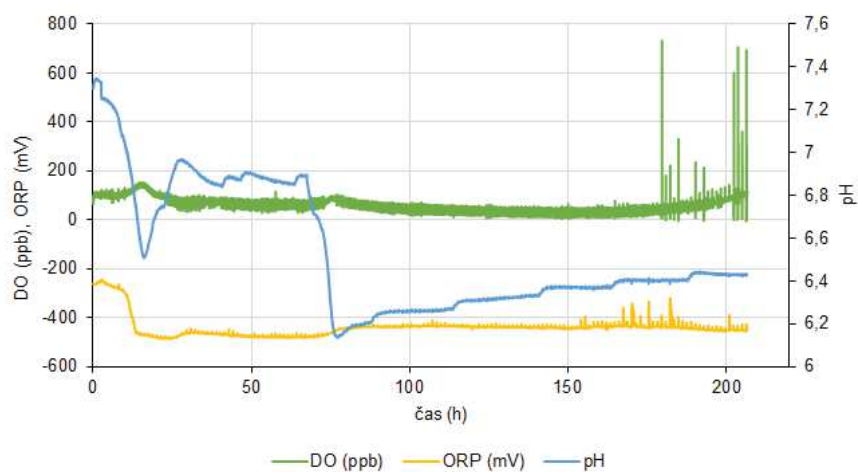
*Příloha II - tabulka 17: množství vznikajících plynů nad médiem v průběhu fermentace fed-batch 6*

substance/čas (h)	0	14	16	20	24	39	45	62	*66
CH <sub>4</sub> (obj. %)	4	7,8	3,4	3,2	3,1	3,1	2	1,9	1,3
CO <sub>2</sub> (obj. %)	14,5	54	26	30	16	26	23,5	23,5	20,5
O <sub>2</sub> (obj. %)	14,7	4,3	15	11,1	16,8	10	11,5	9,85	11,5
H <sub>2</sub> S (ppm)	0	12	5	6	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> (obj. %)	0	1,75	0,19	0,5	0,04	0	0	0	0
substance/čas (h)	68	71	87	113	141	164	188	213	235
CH <sub>4</sub> (obj. %)	1,6	2,1	3,1	2,4	2,4	2,4	2,3	2,7	3,3
CO <sub>2</sub> (obj. %)	24	26	43	28	24,5	20	18	17	14,5
O <sub>2</sub> (obj. %)	12,3	13,1	9,2	9,3	10	10,5	11,5	10,2	9,6
H <sub>2</sub> S (ppm)	18	14	29	5	9	6	4	2	0
H <sub>2</sub> (obj. %)	0,14	0,12	0,68	0,03	0,05	0,03	0	0	0

\*přídavek substrátu

Příloha II - tabulka 18: hodnoty FOS a TAC v průběhu fermentace fed-batch 6

čas (h)	TAC (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS/TAC
0	2654	380	0,143
14	2019	1561	0,77
16	1821	1504	0,526
20	2105	1687	0,801
24	2140	1756	0,821
39	2089	2181	1,044
45	2101	2278	1,084
62	2075	2491	1,200
*66	2066	2548	1,233
68	2013	2573	1,278
71	2005	2798	1,396
87	1659	3680	2,218
113	1664	4008	2,409
141	1718	4269	2,485
164	1718	4489	2,613
188	1707	4434	2,598
213	1832	4675	2,552
235	2073	4547	2,193



Příloha II - graf 6: Časový průběh pH, DO a ORP v bioreaktoru během fermentace fed-batch 6

## Kontinuální fermentace

*Příloha II - tabulka 19: množství organických kyseliny v průběhu fermentace semi-kontinuální 7*

čas (h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
0	-	-	-	-	0,10	-
6	0,01	-	0,67	0,36	0,08	-
24	-	-	0,95	0,66	0,12	0,03
31	-	-	0,82	0,61	0,09	0,02
49	-	-	0,99	0,69	0,10	0,03
55	-	-	0,78	0,60	0,08	0,02
72	-	-	0,91	0,68	0,08	0,03
96	-	-	0,88	0,72	0,07	0,03
120	-	-	0,84	0,74	0,06	0,02
127	-	-	0,70	0,64	0,04	0,02
145	-	-	0,82	0,74	0,04	0,02
169	-	-	0,82	0,72	0,04	0,02

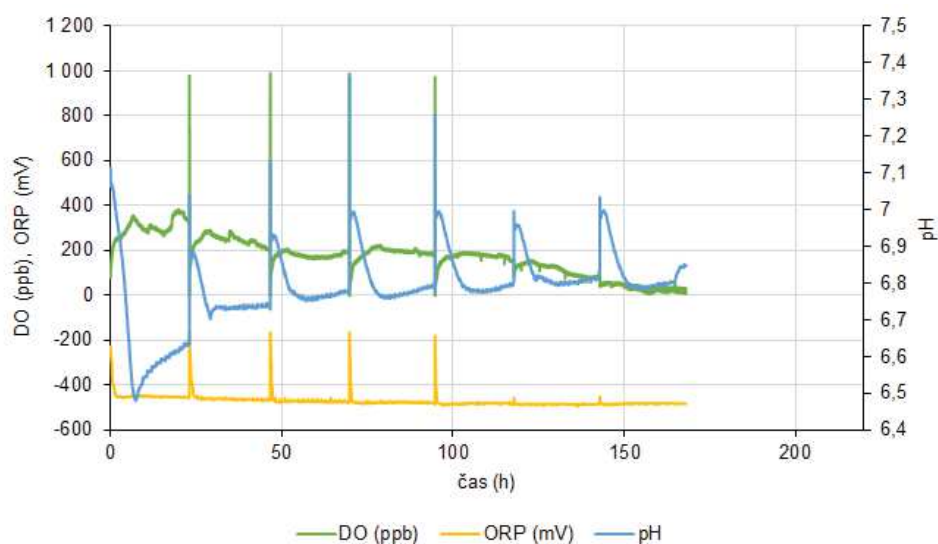
*Příloha II - tabulka 20: množství vznikajících plynů nad médiem v průběhu fermentace semi-kontinuální 7*

substance/čas (h)	0	6	24	31	49	55
CH <sub>4</sub> (obj. %)	5,6	9,2	11,8	4,1	4,3	2,8
CO <sub>2</sub> (obj. %)	19,5	42	42	31	30	18
O <sub>2</sub> (obj. %)	13,5	9	8,3	9,9	9,4	14,4
H <sub>2</sub> S (ppm)	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> (obj. %)	0	0	0	0	0	0
substance/čas (h)	72	96	120	127	145	169
CH <sub>4</sub> (obj. %)	5,3	8,4	9,4	8	9,4	9,2
CO <sub>2</sub> (obj. %)	26	26	27	29	28	28
O <sub>2</sub> (obj. %)	10,9	9,8	10,2	10	8,7	9,1
H <sub>2</sub> S (ppm)	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> (obj. %)	0	0	0	0	0	0



*Příloha II - tabulka 21: hodnoty FOS a TAC v průběhu fermentace semi-kontinuální 7*

čas (h)	TAC (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS/TAC
0	2650	309	0,117
6	2158	1598	0,741
24	2044	2107	1,031
31	1996	1847	0,925
49	1976	2140	1,083
55	1983	1705	0,86
72	1977	1989	1,006
96	2039	1989	0,975
120	2059	1948	0,946
127	2156	1724	0,8
145	2069	1938	0,937
169	2108	1908	0,905



*Příloha II - graf 7: Časový průběh pH, DO a ORP v bioreaktoru během fermentace semi-kontinuální 7*

*Příloha II - tabulka 22: množství organických kyselin v průběhu fermentace kontinuální 8*

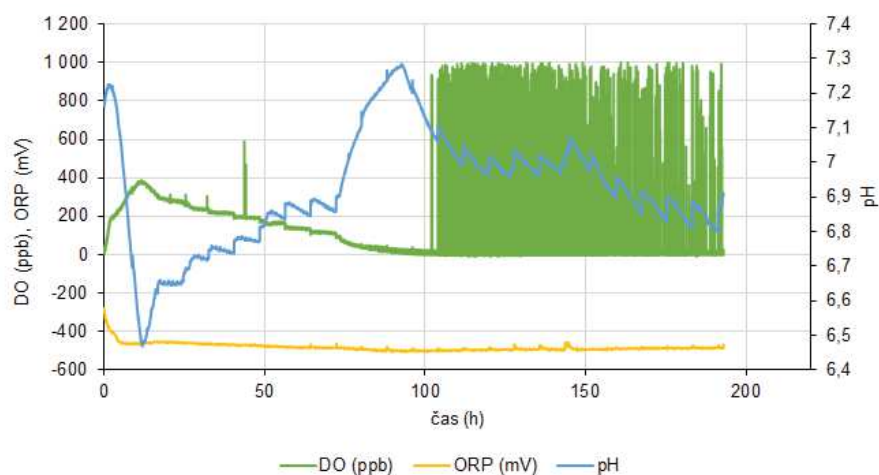
čas (h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
0	-	-	0,01	-	-	-
26	-	-	0,90	0,53	0,16	0,05
50	-	-	1,09	0,64	0,18	-
74	-	-	1,22	0,67	0,19	-
93	-	-	1,29	0,66	0,18	-
125	-	-	1,36	0,64	0,16	-
141	-	-	1,37	0,60	0,15	-
192	-	-	1,16	0,52	0,15	-

*Příloha II - tabulka 23: množství vznikajících plynů nad médiem v průběhu fermentace kontinuální 8*

substance/čas (h)	0	26	50	74	93	125	141	192
CH <sub>4</sub> (obj. %)	5,6	12	8	4,3	3,4	2,8	2,6	3,9
CO <sub>2</sub> (obj. %)	19,5	35	23,5	18	17	15	16,5	22
O <sub>2</sub> (obj. %)	13,5	8,5	10,5	11,8	11,3	10,4	10,5	11,3
H <sub>2</sub> S (ppm)	0	0	0	0	0	0	0	2
H <sub>2</sub> (obj. %)	0	0,03	0	0	0	0	0	0

*Příloha II - tabulka 24: hodnoty FOS a TAC v průběhu fermentace kontinuální 8*

čas (h)	TAC (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS/TAC
0	2565	329	0,128
26	1864	1524	0,818
50	1961	2015	1,028
74	1934	2144	1,109
93	1868	2219	1,188
125	1929	2301	1,193
141	1955	2265	1,159
192	1934	1990	1,029



*Příloha II - graf 8: Časový průběh pH, DO a ORP v bioreaktoru během fermentace kontinuální 8*

*Příloha II - tabulka 25: množství organických kyseliny v průběhu fermentace kontinuální*

9

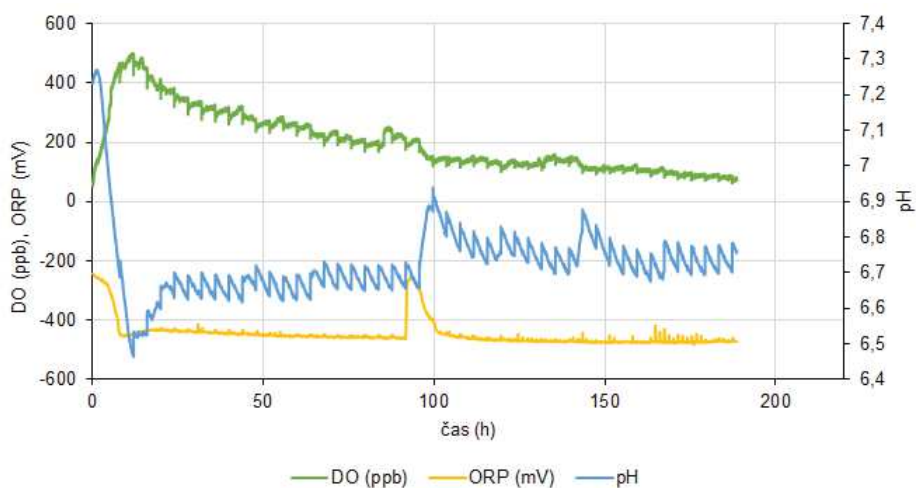
čas (h)	kyselina mléčná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina mravenčí (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina octová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina propionová (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina máselná (g·l <sup>-1</sup> )	kyselina valerová (g·l <sup>-1</sup> )
0	-	-	0,03	-	-	-
21	-	-	0,97	0,37	0,22	-
45	-	-	1,05	0,51	0,19	-
65	-	-	1,03	0,50	0,15	-
97	-	-	1,01	0,46	0,09	-
120	-	-	1,12	0,45	0,07	-
144	-	-	1,13	0,43	0,01	-
169	-	-	1,16	0,44	0,005	-
192	-	-	1,11	0,39	0,002	-

*Příloha II - tabulka 26: množství vznikajících plynů nad médiem v průběhu fermentace kontinuální 9*

substance/čas (h)	0	21	45	65	97	120	144	169	192
CH <sub>4</sub> (obj. %)	0,7	3,0	5,7	6,3	4,9	6,4	7,7	8,6	6,5
CO <sub>2</sub> (obj. %)	6,6	34,0	30	30,0	21,0	27,0	27,0	33,0	29,0
O <sub>2</sub> (obj. %)	19,4	12,3	11,1	11,0	14,2	10,7	9,1	8,7	9,0
H <sub>2</sub> S (ppm)	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
H <sub>2</sub> (obj. %)	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Příloha II - tabulka 27: hodnoty FOS a TAC v průběhu fermentace kontinuální 9

čas (h)	TAC (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS (mg·l <sup>-1</sup> )	FOS/TAC
0	2491	349	0,140
21	1941	1743	0,898
45	1875	1880	1,003
65	1900	1826	0,961
97	1918	1739	0,907
120	1853	1796	0,969
144	1840	1742	0,947
169	1861	1848	0,993
192	1867	1738	0,931



Příloha II - graf 9: Časový průběh pH, DO a ORP v bioreaktoru během fermentace kontinuální 9

## PUBLIKACE A VÝSTUPY V RÁMCI STUDIA

### Publikace v impaktovaném časopisu

1. HUDEČKOVÁ, H.; NEUREITER, M.; OBRUČA, S.; FRÜHAUF, S.; MÁROVÁ, I. 2018. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into lactic acid. *Letters In Applied Microbiology*, 66 (4), 306-312. ISSN: 0266-8254

### Publikace v recenzovaných časopisech

2. HUDEČKOVÁ, H.; ŠUPINOVÁ, P.; BABÁK, L. 2017. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Waste Bread before Fermentation. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65 (1), 35-40. ISSN: 1211-8516.
3. HUDEČKOVÁ, H.; BABÁK, L. 2015. Lactic acid production from waste bread. *Czech Chemical Society Symposium Series*. 13(2), 73-75. ISSN: 2336-7210.

### Plné texty příspěvků a abstrakty z konferencí

1. HUDEČKOVÁ, H.; KECSKÉSOVÁ, V.; OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I. 2018. Utilization of spent coffee grounds by *Lactobacillus plantarum*. Študentská Vedecká Konference Prif Uk 2018 - Zborník Recenzovaných Príspevkov. s. 237-241. ISBN: 978-80-223-4517-0. – prezentace v anglickém jazyce
2. HUDEČKOVÁ, H.; NEUREITER, M.; OBRUČA, S.; FRUHAUF, S.; MÁROVÁ, I. 2018. Utilisation of spent coffee grounds into lactic acid. ICTB Mikulov 2018 – sborník příspěvků. - poster
3. HUDEČKOVÁ, H.; BABÁK, L.; MÁROVÁ, I. 2017. Utilization of food waste for lactic acid production. *Book of Abstracts – Biotech 2017*. s. 179. ISBN: 978-80-7080-989-1. - poster
4. HUDEČKOVÁ, H.; BABÁK, L.; MÁROVÁ, I. 2016. Utilization of grape pomace for lactic acid production. *Book of Abstracts - 8th Central European Conference "Chemistry towards Biology"*. s. 107-107. ISBN: 978-80-7305-777- 0. - poster
5. HUDEČKOVÁ, H.; MYSLIVCOVÁ, P.; BABÁK, L. 2015. Porovnání účinnosti chemické, fyzikální a enzymatické hydrolýzy odpadního pečiva. *Studentská vědecká konference 2015*. s. 150. ISBN: 978-80-7464-741-3. - přednáška
6. HUDEČKOVÁ, H.; ŠUPINOVÁ, P.; BABÁK, L. 2015. Production of bioethanol from waste bread. *Book of abstracts - CEITEC PhD retreat*. Brno: Masaryk university. s. 51-51. ISBN: 978-80-210-7825- 3. - poster
7. HUDEČKOVÁ, H.; BABÁK, L. 2015. Lactic acid production from waste bread. *Chemistry and life 2015 - Book of abstracts*. Brno: Brno University of Technology, Faculty of chemistry. s. 33-34. ISBN: 978-80-214-5228- 2. - poster
8. HUDEČKOVÁ, H.; ŠUPINOVÁ, P.; BABÁK, L. 2014. Use high-performance liquid chromatography for determination of saccharides after the enzymatic hydrolysis of waste bread. *CECE 2014 11<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Ústav analytické chemie AV ČR, s. 252-255. ISBN: 978-80-904959-2- 0. - poster

# ŽIVOTOPIS

## Osobní informace

Jméno: Helena Hudečková  
Trvalé bydliště: Proskovická 664/65, 70030 Ostrava  
Datum narození: 5. 11. 1989

## Vzdělání

2014 – současnost Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Chemie a technologie potravin, obor Potravinářská chemie  
2012 – 2014 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Chemie a technologie potravin, obor Potravinářská chemie a biotechnologie, dosažený titul Ing., téma diplomové práce: Studie možnosti využití odpadního pečiva k bioprodukcí vybraných metabolitů  
2009 – 2012 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Chemie a technologie potravin, obor Biotechnologie, dosažený titul Bc., téma bakalářské práce: Studium růstových a metabolických vlastností vybraných mikroorganismů  
2005 – 2009 Maticní gymnázium v Ostravě, maturitní zkouška: český jazyk, anglický jazyk, chemie, fyzika

## Pracovní zkušenosti

11/2015 – 12/2015 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, vědecko-technický pracovník - laboratoř biotechnologií a biomateriálů  
2/2016 – 9/2016 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, Ph.D. student - laboratoř biotechnologií a biomateriálů

## Zahraniční stáže

10/2016 – 12/2016 University of Natural Resources and Life sciences (BOKU); Department of Agrobiotechnology, Institute of Environmental Biotechnology; Tulln, Austria  
Náplň práce: Optimalizace fermentací kyseliny mléčné na odpadní kávu  
2/2017 – 8/2017 Zurich University of Applied Sciences (ZHAW); Department of life sciences and facility management, Institute of Chemistry and Biotechnology; Wädensville, Switzerland  
Náplň práce: spolupráce na projektu *Microaerobic pretreatment of Fibrous Materials for biogas production*

## Pedagogická činnost

2014/2015 zimní semestr - Praktikum z bioinženýrství  
2017/2018 zimní semestr - Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy UCHPBT